Copenhagen 1949
LANE MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO

AFKALKNINGSPROBLEMER I DEN HISTOLOGISKE TEKNIK

MED BIDRAG TIL

INDRE ØRES HISTOLOGI

AF

Harald K. Kristensen

With an English summary
Avec un résumé français

EINAR MUNKSGAARD
KØBENHAVN 1949

AFKALKNINGSPROBLEMER I DEN HISTOLOGISKE TEKNIK

Tilegnet

MIN MOR

AFKALKNINGSPROBLEMER I DEN HISTOLOGISKE TEKNIK

MED BIDRAG TIL

INDRE ØRES HISTOLOGI

AF

Harald K. Kristensen

With an English summary
Avec un résumé français

EINAR MUNKSGAARD
KØBENHAVN 1949

Denne afhandling er af det lægevidenskabelige fakultet ved Københavns universitet antaget til offentligt at forsvares for den medicinske doktorgrad.

København, den 29. marts 1949

J. Engelbreth-Holm
h. a. dec.

Copyright by
Ejnar Munksgaard
1949

Printed i Denmark
Aalborg Stiftsbogtrykkeri

INDHOLD

Indledning. Definition af histologisk afkalkning; problemstilling 9

Kapitel I. Oversigt over afkalkningens teknik 12

Kapitel II. Teknik ved undersøgelser af afkalkningen 27

A. Tidligere systematiske undersøgelser 27

B. Andre tidligere undersøgelser 32

1) Fixation 32

2) Hærdning 37

3) Afkalkning 38

a) Syreart og -styrke 38

b) Afkalkningens slutpunkt 41

4) Indlejringsmetoder 43

5) Farveresultater efter afkalkning 45

Kapitel III. Egne undersøgelser over afkalkning i almindelighed (modelforsøg) 49

A. Fixation 49

B. Vurdering af fixationen 50

1) Postmortel fixation 50

2) Intravital fixation 52

C. Afkalkningen 62

1) Afkalkningsobjekter 62

2) Metoder til vurdering af afkalkningen 66

3) Afkalkende medier 72

D. Vurdering af afkalkningen 78

1) pH-målinger 78

2) Afkalkningstid og -forløb 84

a) Syrer af forskellig normalitet 88

b) Temperaturens indflydelse 91

c) Forsøg med brugte syreopløsninger 91

d) Anvendeligheden af alkoholiske contra vandige syreopløsninger 93

e) Syrer med anvendelse af elektrolyse 98

3) Farveresultater efter afkalkning 99

a) Ribbensmodelforsøg 101

b) Knoglepladeforsøg 106

Sammenligningsmikroskopi af formolfixeret rygmarv 106

Fotometri på alkoholfixerede kernesnit 111

4) Overafkalkning 114

5) Afkalkningstider sammenlignet med kernefarvningsresultater 116

E. Fixation contra afkalkning 116

F. Vurdering af efterbehandlingens betydning ... 118
1) Farveundersøgelser ... 119
2) Undersøgelser over volumenændringer med pyknometer ... 121

Kapitel IV: Oversigt over labyrinthens histologi ... 125

Kapitel V. Egne labyrinthundersøgelser ... 138

A. Fixation ... 138

B. Vurdering af fixationen ... 140
1) Mikroskopi af nyrekontrolvæv ... 140
2) Mikroskopi af organon Corti og ganglieceller ... 141
3) Fasekontrastmikroskopiske undersøgelser ... 145

C. Afkalkning ... 148

D. Indlejringen ... 150

E. Vurdering af afkalkningen ... 152
1) Afkalkningstiden ... 152
2) Farveresultater ... 152
3) Labyrinth-pH-målinger ... 159

F. Anvendte farvemetoder ... 160

Forsøgsprotokol ... 162
Modelforsøg ... 162
Fixationsforsøg ... 166
Røntgenforsøg ... 167
Tidsfaktoren contra kernefarvningen ... 175
Fotometertavler ... 177
Farveresultater efter afkalkning ... 181
Forsøg over volumenændringer i tilslutning til afkalkning ... 211
Forsøg over fixationen ... 213
Forsøg over labyrinthafkalkning ... 215
Labyrinthundersøgelser ... 216
Labyrinth-pH-forsøg ... 221

Sammendrag ... 224

Tavler over pH-forforsøg ... 230

pH-tavler I—X ... 234

Tavler over røntgenforsøg I—XIV ... 244

Resumé ... 256

Summary ... 261

Litteraturfortegnelse ... 266

FORORD

De her meddelte undersøgelser er foretaget efter tilskyndelse fra professor, dr. med. Harald Okkels og dr. med. G. Vraa-Jensen i årene 1946–48.

De histologiske præparationer tillige med de indledende modelforsøg fandt sted på Medicinsk-anatomisk Institut, medens de senere modelknoglepladeforsøg af praktiske grunde foretoges på det til Rigshospitalets øreafdeling knyttede laboratorium — begge steder under de mest ideelle arbejdsbetingelser.

Under arbejdets udførelse har jeg gennem talrige samtaler modtaget hjælp og vejledning fra professor, dr. med. Harald Okkels og dr. med. Gustav Vraa-Jensen, ligesom min chef, professor dr. med. Anders Thornval på mange måder har opmuntret mig.

Professor, dr. phil. N. Bjerrum og dr. phil. A. Hoff-Jørgensen har ydet mig bistand ved forskellige kemiske detailspørgsmål, og dr. phil. A. Tovborg-Jensen foretog de røntgenspektrografiske undersøgelser for mig.

Med professor, dr. med. Flemming Møllers tilladelse foretoges kontrolrøntgenfotograferingerne på Rigshospitalets røntgenafdeling, hvorunder denne afdelings sygeplejersker og røntgenfotografer var mig meget behjælpelige.

Afkalkningsforsøgene ved lave temperaturer fandt med professor, dr. med. Warburgs tilladelse sted på afd. B.s laboratorium, og ved fotometermålingerne fik jeg ved afdøde professor, dr. med. Sonnes velvilje tilladelse til at benytte Pulfrich fotometret på afd. A.s laboratorium.

Firmaet »Broch & Michelsen« stillede et mikrolæseapparat til min disposition, firmaet »Struer« et autojonometer.

Professor Sørensen, Den kongelige Veterinær- og Landbohøjskole, og amanuensis, dyrlæge Anker Hansen, var mig behjælpelige med fremskaffelsen af det bedst egnede materiale til modelknoglepladerne. Materialet til fremstilling af kerne- og rygmarvssnittene fremskaffedes ved hjælp af hr. afdelingsdyrlæge Isaksen, Københavns Flæskehaller.

Hr. laboratoriemester Persson, Gymnastikteoretisk Laboratorium, hjalp mig med fremstillingen af modelknoglepladerne.

Med tilladelse fra professor Glimstedt, Histologiska Institutionen, Lund, foretog jeg med assistance af dr. med. B. Gustavsson og hr. præparator Larsson de fasekontrastmikrofotografiske optagelser.

Ved fotografering af tal-, kurve- og billedmateriale har hr. laboratoriemester Holm, Medicinsk-anatomisk Institut været mig behjælpelig.

Min hustru har foretaget mikrotomeringen af de fleste af de i arbejdet anvendte præparater.

Under arbejdets udførelse og til dets publikation er der ydet mig økonomisk støtte fra P. Carl Petersens Fond og fra Universitetsfonden for unge Videnskabsmænd.

Jeg beder herved enhver, der har været mig behjælpelig med arbejdets udførelse, modtage min varmeste tak.

København, februar 1949.

Harald K. Kristensen

INDLEDNING

Når man vil fremstille histologiske snit af knoglevæv eller tandvæv, eller hvad der kommer ud på eet, vil fremstille snit af væv, der er intimt forbundet med ovennævnte vævsarter, må man afkalke. Kun herved bliver vævet tjenligt til mikrotomering.

Dette forhold skyldes, at der i knoglevæv findes store mængder uorganiske substanser, betingende vævenes stivhed og ligeledes betingende ødelæggelse af mikrotomkniven ved forsøg på at fremstille snit til histologisk brug. Ganske vist er der de senere år blevet konstrueret meget hårde knive, med hvilke man under særlige forhold er i stand til at skære uafkalket knoglevæv. Denne fremgangsmåde finder dog i almindelighed ikke større anvendelse.

Mængden af uorganisk substans (knogleaske) angives noget varierende, men med almindelig enighed om, at langt den største del udgøres af fosforsur kalk (hydroxylapatit), medens en mindre, ikke uvæsentlig del, udgøres af kulsur kalk (calcit) *(Gerlach, Frey, Brandenberger & Schinz)*. Efter nogle af de nyeste undersøgelser af *Brandenberger & Schinz* er den procentiske sammensætning ved røntgenspektografi følgende:

	Ca	PO_4	CO_3	Mg	Na	K
Menneske	35.09	46.50	5.69	0.36	0.44	0.07
Marsvin	35.07	47.37	4.87	0.56	0.46	0.13

Såvel calcit som hydroxylapatit er meget tungtopløseligt i vand. Således er opløselighedsproduktet for calcit 0.99×10^{-8} ved 15°, hvilket vil sige, at kun en ringe mængde karbonationer og kalciumioner kan være tilstede samtidigt i vandig opløsning. Sætter man en stærk syre til vandet, opløses karbonatet let. Karbonationerne forbinder sig nemlig nu med syrens brintioner til kulsyre efter følgende skema:

$$CaCO_3 + 2\,H^+ \rightarrow Ca^{++} + H_2CO_3\,,$$

hvor kulsyren afgiver vand og derefter forsvinder som kuldioxyd efter skemaet:

$$H_2CO_3 \rightarrow H_2O + CO_2$$

På denne måde kan store mængder kalciumcarbonat gå i opløsning, uden at dettes opløselighedsprodukt nås.

Ved tilsætning af stærk syre til hydroxylapatit vil også denne gå i opløsning

som følge af den sekundære og tertiære fosfations stærkt basiske egenskaber. Ligevægten vil hele tiden forskydes mod højre efter følgende skema:

$$Ca_5(PO_4)_3\,OH \rightarrow 5\,Ca^{++} + 3\,PO_4^{---} + OH^-,$$

hvor H-ioner forbinder sig med OH^- til H_2O, og med PO_4^{--} til HPO_4^- og fremdeles HPO_4^{--} med H^+ til $H_2PO_4^-$ samt endelig til H_3PO_4, i hvilken form de to sidstnævnte fosfatrester forekommer i syreopløsninger.

Altså frigøres Ca^{++} for både calcitens og hydroxylapatitens vedkommende let ved behandling med syre. *På dette forhold beror afkalkningen, som altså er en fjernelse af de uorganiske bestanddele i knoglevævet ved hjælp af syre.* Afkalkning kan derfor betegnes som en kemisk proces af heterogen type *(Bjerrum)*, hvor den kemiske proces foregår mellem det faste stof (vævet, der skal afkalkes) og en vædske (afkalkningsmidlet). Reaktionshastigheden af denne kemiske proces må derfor som andre kemiske processer af tilsvarende natur være afhængig og påvirkelig af ydre faktorer, således at processen forløber hurtigere, jo højere temperaturen er, og således at koncentrationen (i dette tilfælde af syrerne) spiller en rolle derved, at der i almindelighed finder en hurtigere omsætning sted i mere koncentrerende opløsninger. Desuden gælder for heterogene processer, at reaktionshastigheden er afhængig af størrelsen af overfladen mellem de to faser, der virker på hinanden, samt af omrøringens grad, idet processen forløber hurtigere, når der hele tiden sørges for, at frisk syre kommer i berøring med det væv, der skal afkalkes. Endelig er reaktionshastigheden afhængig af syrens art, idet man taler om, at visse syrer er stærkere end andre. For at kunne anstille en sammenligning må man benytte syrerne under ens forhold og af tilsvarende koncentrationer (for eksempel i normale eller molære opløsninger).

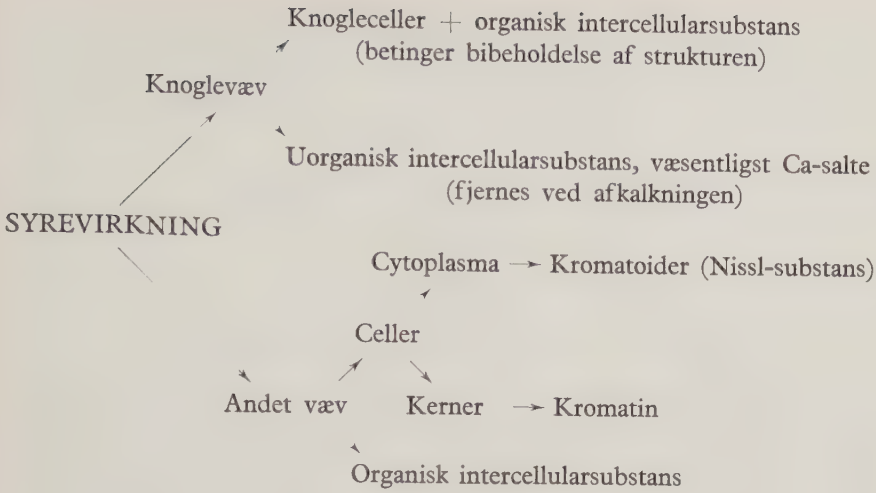
Efter afkalkningen resterer den organiske substans, der som en slags matrix bibeholder vævets ydre form, dog således at vævet nu i fysisk henseende får en konsistens svarende til hyalin brusk. Det vil sige, at vævet er skærbart *(Gerlach)*.

Herved er den ene side af sagen nået, men samtidigt melder sig forskellige vanskeligheder, forårsagede af syrernes skadelige indflydelse på det organiske væv. Disse vanskeligheder ytrer sig ved ændringer af struktur og farvbarhed af vævene i tilslutning til afkalkningen — ændringer som til trods for den forudgående fixation må antages at bero på ændringer af de proteinstoffer, som sammensætter det organiske væv.

Det er min opgave at søge at opnå god skærbarhed af knoglevæv under samtidig reduktion af nogle af de vanskeligheder, som forårsages af ovenfor omtalte ændringer af det organiske vævs struktur og farvbarhed i tilslutning til afkalkning.

En klarlæggelse af naturen af de af afkalkningen forårsagede ændringer i den organiske substans ligger uden for den opgave, jeg har stillet mig i dette arbejde.

Skematisk kan de forskellige faser i afkalkningen stilles op i omstående skema:


Knogleceller + organisk intercellularsubstans
(betinger bibeholdelse af strukturen)
Knoglevæv
Uorganisk intercellularsubstans, væsentligst Ca-salte
(fjernes ved afkalkningen)
SYREVIRKNING
Cytoplasma → Kromatoider (Nissl-substans)
Celler
Andet væv
Kerner → Kromatin
Organisk intercellularsubstans

KAPITEL I

OVERSIGT OVER AFKALKNINGENS TEKNIK

I modsætning til andre anvendte undersøgelsesmetoder, er man for afkalkningens vedkommende ikke i stand til at fastsætte tidspunktet for, hvornår man begyndte at anvende den som afkalkning i ordets egentlige forstand: d. v. s. fjernelse af knoglevævets uorganiske bestanddele (væsentligst kalksalte) for at bringe det hårde væv i en tilstand, hvor det kunde skæres til histologiske snit. Grunden hertil må søges i, afkalkningen som metode er opstået lidt efter lidt af de mange macerations- og kogemetoder, som anatomer og mikroskopikere i høj grad anvendte i begyndelsen af det forrige århundrede.

Det er sikkert ikke nogen tilfældighed, at det var en anatom, med speciel interesse for ørets anatomi, som først tog syre i brug som en slags afkalkningsmiddel. *Scarpa* (ca. 1800), som har gjort ret nøje rede for anatomiske detailler i opbygningen af den benede labyrinth hos mennesket, var som følge af den benede labyrinths overordentligt vanskeligt tilgængelige beliggenhed i pars petrosa nødsaget til at foretage macerationer af knoglevævet. Hertil anvendte han fortyndede opløsninger af saltsyre. Herved opnåede *Scarpa* at faa den meget kompakte substantia ossea, der danner labyrinthkapslen, til at stå tilbage, medens det noget mindre kompakte, omgivende knoglevæv opløstes.

Først i 1845 kan man atter finde syre anvendt til maceration af knoglevæv, idet *Hyrtl* i sine sammenlignende-anatomiske undersøgelser over det indre øre hos dyr og mennesker, efter først at have kritiseret de ældre præparationsmetoder med anvendelse af mejsel og skrabejern, angav en udstøbningsmetode med injektion af en blanding af vox og harpiks tilsat blyhvidt, med påfølgende corrosion af knoglevævet ved hjælp af en blanding af 6 dele saltsyre og 1 del vand. Efter ca. 1 uge kunne han skylle knogleresterne væk og udstøbningen blev stående tilbage.

Begge metoderne må betegnes som meget hårdhændede, men de var også kun beregnede på at give kendskab til bygningen af den benede labyrinthkapsel.

Anvendelse af syre til afkalkning i den gængse betydning er første gang beskrevet af en forsker med interesse for det indre øre: *Koelliker*, som i 1852 i sin »Handbuch der Gewebelehre des Menschen« under undersøgelsesmetoder for høreorganet angav, at man for at se nerveplexet i zona ossea, må fjerne kalksaltene i denne med fortyndet saltsyre.

I *Strickers* »Handbuch der allg. u. spez. Gewebelehre des mensch. Körpers« fra 1854 omtalte *Gerlach* under afsnittet knoglevæv, at man let kan fjerne de

uorganiske bestanddele ved at bringe knoglerne i fortyndet saltsyre eller salpetersyre. Dette er første gang salpetersyre er nævnt, men som det fremgår senere i kapitlet er denne kalkopløsende evne hos salpetersyre og saltsyre kun noteret med henblik på undersøgelser over sammensætningen af de uorganiske bestanddele i knoglevævet.

Af kapitlet om snitpræparater i samme bog fra 1871 fremgår, at der ikke har været tænkt på afkalkning, idet snit af knogler fremstilles som savesnit og snit af tænder som slibesnit.

I 1854 anførte *Reissner* om sine labyrinthundersøgelser, at de væsentligst fandt sted på ældre fostre, hvor ossificationen ikke var fuldstændig. Vil man sammenligne med ældre dyr, må man macerere tindingebenet i nogle dage med saltsyre. Man kan da efter udvaskning i vand foretage axesnit med en skarp skalpel.

Samme år angav *Koelliker* under undersøgelse af de »*Cortiske* tænder«, at disse opløstes øjeblikkeligt i ætsnatron og kalilud. Det samme var tilfældet med salpetersyre og svovlsyre. Ret stærk eddikesyre fik dem til at svulme, medens kromsyre fik dem til at skrumpe. Publikationer af denne art har sikkert været medvirkende til, at man de følgende årtier af hensyn til cytologiske undersøgelser på det indre øre var utilbøjelig til at anvende andre afkalkningsmetoder end svage kromsyreopløsninger, som iøvrigt kun kunne anvendes på de lidet kalkholdige labyrinther fra fostre eller nyfødte dyr. I samme retning har *Boettchers* erfaringer med syrer sikkert virket, idet denne anvendte afkalkning med 5 og 10% saltsyre, begge med dårligt resultat — det sidste dårligst.

Samme forfatters forsøg med fosforsyre, mælkesyre og citronsyre slog fuldstændigt fejl, uvist af hvilken grund. Der er ikke gjort rede for, i hvilke styrker, syrerne har været anvendt, og heller ikke for, hvilke kriterier, der er taget som udtryk for dårligt resultat.

Først i 70erne begynder afkalkning som led i den histologiske teknik at trænge igennem. *Loewenberg* foretog ved undersøgelse af det indre øre hos mennesket og pattedyr, omend kun nødtvunget, fjernelse af kalksaltene ved hjælp af fortyndet saltsyre, som efter hans erfaring ikke angreb organon Corti, vel at mærke efter fixation i kaliumbikromat, kromsyre eller Müllers vædske. Sidstnævnte var allerede bemærket af *Corti* i dennes banebrydende arbejde fra 1851.

Gottstein (1872) anbefalede til afkalkning anvendelse af 1/4–1%kromsyre eller 0,1% klorpalladium tilsat 1/10 saltsyre efter forudgående fixation med klorpalladium eller overosmiumsyre, ½–1%. Samme år anbefalede *Mosely* (også til labyrinthundersøgelser) afkalkning ved hjælp af ½% kromsyre, som bedre egnet end saltsyre. Den aktive substans i kromsyren skulle efter forfatterens mening være forureninger med svovlsyre.

Pritchard omtalte i sine mikropræparationsmetoder til undersøgelse af cochlea (1872), at man kan bruge salpetersyre eller saltsyre, hvor den første foretrækkes i en styrke af ½–1%, øjensynligt efter at have foretaget undersøgelser med forskellig syrestyrke.

Hensen (1873) anvendte til svagt kalkholdige cochleae 1% kromsyre, til stærkere kalkholdige snegle 5–10% saltsyre, og i sidstnævnte tilfælde blev vævet først efter afkalkningen anbragt i Müllers kaliumbikromatopløsning!

Strelzoff (1873) og *Busch* (1877) synes at være de første, som udelukkende

med henblik på den mikroskopiske knogleundersøgelse har foretaget en systematisk gennemprøvning af forskellige syrer med vurdering af resultaterne ved hjælp af henholdsvis hæmatoxylin-karmin- og hæmatoxylin-eosinfarvningen. *Strelzoff* foretager fremdeles sine undersøgelser på embryonalt knoglevæv, fixeret i Müllers vædske. Iøvrigt har forfatteren forsøgt med saltsyre, eddikesyre, fosforsyre og træeddike og fundet, at koncentreret træeddike gav de bedste objekter. Saltsyren fandt han ganske forkastelig, idet den macererede det embryonale væv, selv efter tilsætning af Müllers vædske. Desuden har han iagttaget, at koncentreret eddikesyre i almindelighed får vævene til at svulme op, selv om man kan formindske dette ved tilsætning af vinånd. *Busch* foretog en opgørelse mellem slibemetoden og skæring efter afkalkning. Førstnævnte metode var forbundet med mange ulemper, idet knogleslib var vanskelige og tidrøvende at fremstille. De kunne kun fremstilles i få eksemplarer, det var vanskeligt at opnå større forstørringer, og de brækkede let. *Busch* pointerede nøvendigheden af at anvende en syre, som fjernede kalksaltene under skånen af den organiske substans. Såvel organiske som uorganiske syrer kom i betragtning, idet forfatteren til den første gruppe regnede saltsyre, salpetersyre, fosforsyre og kromsyre, til den sidste eddikesyre, mælkesyre, træeddike og pikrinsyre. Forfatteren selv fandt salpetersyren langt den bedste og tillagde den den fordel, at man kunne afkalke fra det kraftigste til det sarteste væv, blot ved at ændre koncentrationen af syren. Iøvrigt var det forfatterens erfaring, at 8 dage i 10% salpetersyre var bedre end 14–16 dages ophold i en 5% opløsning. Eddikesyren, mælkesyren og træeddiken (konc.?) fandtes alle at have en ret stor afkalkende effekt, men de fik vævet til at kvælde og kunne slet ikke måle sig med salpetersyren. Selv efter denne afkalkning måtte forfatteren indrømme, at det ikke altid lykkedes at få ordentlige dobbeltfarvninger med hæmatoxylin-eosin, således at kernerne i f. eks. bruskceller ofte blev rent røde! Pikrinsyre, som allerede var angivet af *Ranvier* (1868) fandt forfatteren for langsomt arbejdende og uanvendelig til sine undersøgelser.

I »The Micromists Vademecum« af *Lee* fra 1885 er afsnittet om afkalkning kun en gentagelse af indholdet i *Busch's* arbejde, men herudover er som afkalkningsmidler anført 50% saltsyre med en meget hurtig afkalkende virkning. Endelig står der omtalt, at man skal undgå pikrin-svovlsyre på grund af dannelse af gipskrystaller under processen.

Flemming (1886) anvendte til demonstrationsbrug i stedet for knogleslib udtørrede snit af afkalkede knogler. Han afkalkede i en blanding af kromsyre, saltsyre og spiritus, uden iøvrigt at gøre rede for syrernes styrke og indbyrdes fordelingsforhold.

I *Ranviers* lærebog i histologisk teknik er der under afsnittet om undersøgelsesteknikken ved det indre øre anført følgende reagenser til afkalkning: Kromsyre, kloriltesyre, pikrinsyre og myresyre, medens han som tidligere omtalt bruger væsentligt stærkere syrer, når det drejer sig om afkalkning af knoglevæv i almindelighed. Afkalkning med myresyre angaves at være ufuldstændig og måtte afsluttes med rigelige mængder mættet pikrinsyreopløsning.

Politzers bog: »Zergliederung des menschlischen Gehörorganes« (1889) indeholder foruden et par store afsnit om det menneskelige øres anatomi og pathologiske anatomi i sin anden del en grundig gennemgang af histologiske undersøgel-

sesmetoder for normale og pathologiske ører og herunder et fyldigt afsnit om afkalkning. *Politzer* (een af otologiens forgrundsfigurer og pionerer) indledede sidstomtalte afsnit med, at man for at afkalke knogleskelettet i høreorganet udelukkende må anvende vandige opløsninger af mineralsyrer i vekslende koncentrationer. Han skelner mellem:

1) længere varende og mere skånsomme metoder og

2) hurtigmetoden, ved hvilken man anvender højere koncentrationer af syrerne.

Der anføres følgende afkalkningsmetoder:

1) *Müllers* vædske, der samtidigt virker fixerende, er i stand til at afkalke meget små knoglestykker og blødere knogler (fra fostre, nyfødte og unge dyr), medens den intet er værd ved afkalkningen af voksnes tindingeben på grund af det ringe indhold af fri kromsyre. Tilsætning af 5–10 dråber koncentreret salpetersyre til ½ liter Müllers vædske skulle ikke virke kompromitterende på farveresultatet med f. eks. Weigerts hæmatoxylin.

2) *Waldeyers* kromsyremetode, hvor afkalkningen finder sted med kromsyre i vandig opløsning efter følgende metodik: Til at begynde med anvendes en svag kromsyreopløsning (1 : 600), så en stærkere opl. (1 : 400), derefter 1 : 200, og for yderligere at fremskynde processen tilsættes efter 5–6 dage for hvert 100 g kromsyreopløsning 2 g officinel salpetersyre. I denne vædske finder afkalkningen sted i løbet af ca. 3 måneder. Imidlertid kan der selv efter denne tid i nærheden af det indre øre være ikke afkalkede knoglekerner, som ikke mere kan fjernes uden at ødelægge den øvrige del af præparatet. Forfatteren anfører, at der ikke sjældent kommer forandringer i det Cortiske organ ved kromsyre-salpetersyreafkalkningen, bortset fra, at man ofte risikerer, at præparaterne bliver for bløde og falder hen i en ubrugelig, sprød masse.

3) *Pikrinsyre* i mættet, vandig opløsning blev anvendt til afkalkning af embryonale og foetale tindingeben, men er iøvrigt ikke anbefalelsesværdigt på grund af den yderst langsomme virkning.

4) *Salpetersyreafkalkning:* Der anføres en vædske sammensat af 100 dele vand, 3½ del salpetersyre og ¾ dele klornatrium. Opløsningen anvendes i stor mængde og skal skiftes daglig. Til undersøgelse af det indre øre anbefaledes det i forvejen at behandle præparatet med Müllers vædske eller med osmiumsyre. Til undersøgelse af mellemøret eller det ydre øre er det ofte nok at anbringe præparatet i afkalkningsvædsken, idet en 3% salpetersyreopløsning anføres som et udmærket hærdningsmiddel. Sidstnævnte metode anbefaledes til pathologiske studier, specielt til studiet af kernedelingsfigurer, som ved metoden gøres særligt let synlige. Afkalkningen af det menneskelige tindingeben tager på denne måde 20–25 dage.

5) *Saltsyreafkalkningen* bør ved anvendelse på høreorganet anvendes i alkoholisk opløsning og bedst med tilsætning af ringe mængde klornatrium. Som undersøgelsesmetode overfor labyrinthen er den ikke at anbefale på grund af skadelig virkning på labyrinthdannelserne: Maculae acusticae og organon Corti, men den kan anvendes som hurtigmetode til fremstilling af topografiske snit gennem høreorganet. Til sidstnævnte formål anbefaledes desuden en blanding af 5–15 dele koncentreret saltsyre, 1000 dele spiritus, 200 dele vand og 5 dele NaCl, hvor sidstnævnte skulle hindre kvældning af bindevævet. Der skulle anvendes store mængder af vædsken, og der skulle skiftes dagligt.

Van der Stricht (1889) anvendte den af *Flemming* omtalte vædske på små stykker under gentagen fornyelse af denne.

I 1891 fremkom den første teknisk-histologiske afhandling over afkalkning, dog uden at forfatteren *(Haug)* har omtalt hvilke undersøgelsesmetoder (specielt farvemetoder), der er anvendt for at klassificere resultaterne, og uden at omtale, hvordan de sammenlignende undersøgelser er sat i scene. Forfatteren omtalte indledningsvis, at han som otolog i højere grad end de fleste måtte beskæftige sig med undersøgelser over afkalkningen. Desuden omtaltes bestræbelserne for at få det fasteste og hårdeste væv, knoglevævet, i en stand, der tillod mikroskopisk undersøgelse i højere grad end slibesnittene. Bestræbelserne gik ud på at finde metoder hertil ad kemisk-fysiologisk vej. Da det var bekendt, at knogler for en stor del bestod af fosfor- og kulsur kalk, måtte man fjerne disse. Hertil måtte anvendes syrer, der kunne opløse kalksaltene. Iøvrigt skelnede forfatteren mellem langvarige, skånende metoder, og hurtigere metoder. Til de langvarige metoder hører afkalkning med kromsyre, pikrinsyre, mælkesyre og fosforsyre, til de hurtige saltsyre, salpetersyre og floroglucinsalpetersyre, hvor sidstnævnte metode er den yngste og angivet af *Andeer* (1885). Kromsyre i en 2% opløsning angaves meget langsom, gav en mængde udfældninger og beskadigede farvbarheden. Kromsyrens salte, væsentligst i form af *Müllers* vædske var kun anvendelig til små knogler og tog uforholdsmæssig lang tid. Begge metoder frarådedes på det kraftigste af forfatteren. Pikrinsyren anvendt i vandig opløsning var meget langsom, men skulle ellers give gode præparater. Mælkesyre i 10% opløsning anbefaledes som skånende, og meget hurtigere virkende end pikrinsyre. Fosforsyre i 10% opløsning virkede langsomt og gav ikke nogen god farvbarhed.

Saltsyre i 0.5–10% vandige opløsninger virkede meget hurtigt, men ikke skånende, idet der fremkom kvældning af grundsubstansen. Dette forhold søgte *v. Ebner* (1875) at hindre ved tilsætning af kogsalt.

Salpetersyre i 3–9% opløsning var hurtigt virkende, men bibeholdt i modsætning til saltsyre strukturerne bedre. Forf. anså anvendelse af alkoholisk opløsning af salpetersyre som væsentlig bedre end den vandige opløsning.

Floroglucin-salpetersyreafkalkningen tog kun dage eller timer, hvor andre metoder tog uger eller måneder, uden at det i betydende grad gik ud over vævene. Efter forfatterens angivelser gav metoden overordentligt skarpe, i enhver henseende godt farvede billeder.

Zagelmeier angav samme år afkalkning med 10% salpetersyre med godt resultat, og *Thoma* angav i lighed med *Haug* en metode baseret på anvendelsen af alkoholisk salpetersyreopløsning (5 rumdele 95% alkohol og 1 rumdel officinel, ren koncentreret salpetersyre), hvor præparaterne inden afkalkningen gennemtrængtes af 95% alkohol og efter afkalkningen skylledes i 96% alkohol. Således behandlede præparater angaves at lade sig farve lige så godt som før afkalkningen.

1892 og 1895 fremkom fra tysk og engelsk side nogle af de første arbejder om afkalkningsmetoder anvendt ved den histologiske undersøgelse af tandvævet. Både *Lepkowsky* og *Hopewell-Smith* omtalte i lighed med Busch (1877) de møjsommelige slibesnitmetoder til undersøgelse af knogler og tænder i modsætning til den mere moderne afkalkning med syrer. Ved fremkomsten af *Hopewell-Smith's* bog »Dental Microscopy«, var anvendelsen af syrer til afkalkning stærkt misrekommanderet.

Til trods herfor hævdede forfatteren, at fordelene måtte være indlysende: Tyndere snit i næsten så stort et antal, man ønsker. God farvbarhed, lettere skæring, mulighed for større forstørringer, ligesom anstrengelserne ved præparationen er reducerede til et minimum. *Lepkowsky* fandt mineralsyrer alt for stærke, selv efter tilsætning af glycerin eller kogsalt. Han overførte i stedet *Ranviers* myresyremetode på sine tandundersøgelser, men anvendte en noget anden sammensætning: 6 dele 1% vandig opløsning af guldklorid og 3 dele ren myresyre (*Ranvier* 9 dele 1% guldklorid og 1 del myresyre). Han anvendte endelig ren myresyre alene til fuldstændig afkalkning, uden at præparaterne på nogen måde stod tilbage for de, der havde været udsat for salpetersyre i flere uger. *Hopewell-Smith* omtalte, at der efterhånden var mange afkalkningsvædsker, der anvendtes i histologien og de mest kendte var: Saltsyre, salpetersyre, pikrinsyre, kromsyre, eddikesyre og arsensyre, nævnt i rækkefølge efter den betydning, man tillagde dem ved tandmikroskopi. De nævnte syrers styrkeangivelse er meget varierende, men som helhed anbefalede *Hopewell-Smith* anvendelse af stærke syreopløsninger frem for svage. Således anvendte han selv til afkalkning følgende syreblanding: HCl, ren, 12 dele, — HNO_3, ikke rygende, 30 dele, — aqua destillata, 108 dele.

1899 anbefalede *Schmorl* følgende afkalkningsmetoder til undersøgelse af de finere knoglestrukturer: *v. Ebners* kogsalt-saltsyreblanding i alkohol (sammenlign *Politzer*), salpetersyre efter *Thoma* (alkoholisk salpetersyre), salpetersyre-formol eller Müller-salpetersyre (100 : 3). Forfatteren tilføjede dog, at der kun af og til sås gode resultater.

Samme år fremkom *Ziegler* med en teknisk-histologisk studie over afkalkningen, udsprunget af følelsen af mangel på en tilfredsstillende metode til undersøgelse af større knoglestykkers histologiske forhold ved heling af brud. Forfatteren efterforskede en metode, hvorved vævet bibeholdtes uforandret, og hvor afkalkningen foregik forholdsvis hurtigt. Efter at have prøvet de kendte metoder uden at få tilfredsstillende resultater, stødte han på svovlsyrlingen, som langt overtraf de ham kendte afkalkningsmidler.

Inden gennemgangen af de forskellige gennemprøvede metoder omtalte forf. betydningen af en god fixation, hvor formalin i en 4% vandig opløsning syntes at være andre midler overlegen.

Til undersøgelsen anvendtes humeri af udvoksede marsvin skåret i længdesnit.

Så vidt det kan ses, er der til undersøgelsen anvendt farvning med forskellige hæmaluner. Følgende afkalkningsvædsker undersøgtes:

1) Kromsyre og dens salte, væsentligst i form af Müllers vædske gav ringe afkalkning på grund af ringe indhold af kromsyre. Den kan kun anvendes på små stykker og bevirker desuden, at cellestrukturen bevares dårligt, idet kromsyren virker stærkt skrumpende på cellerne samt nedsætter vævenes farvbarhed. Kromsalpetersyre og ren kromsyre i 2% opløsning kunne afkalke hurtigere, men farvningerne var slette og udistinkte.

2) Den af *Ranvier* anbefalede pikrinsyre virker alt for langsomt.

3) Træeddike er på grund af den langsomme decalcination ikke egnet til større stykker.

4) Saltsyre, som tidligere har været det mest benyttede afkalkningsmiddel fra

1–10% opl. får vævet til at kvælde. Ved anvendelsen af v. Ebners kogsalt-saltsyreblanding er der fundet dårlig farvbarhed og dårlig skærbarhed.

5) Salpetersyre, anbefalet af *Strelzoff* (1873) fremkalder ikke så udtalte kvældninger som saltsyre, afkalker ret hurtigt under bevarelse af celle- og kernestrukturer, især mitoser *(jvf. Politzer)*. Farvbarheden er forholdsvis god. Det samme gælder en 5% salpetersyreopløsning tilsat mættet kogsaltopløsning og 95% alkohol i lige dele. *Thomas* salpetersyrealkohol giver ret hurtig afkalkning, men samtidigt celleskrumpning og slet farvbarhed i forbindelse med, at stykkerne bliver helt skøre.

Den af *Andeer* og *Haug* anbefalede anvendelse af floroglucin har efter flere forsøg været skuffende. Der var forholdsvis hurtig afkalkning, men præparaterne var meget vanskelige at skære, og man kunne ikke opnå distinkt farvning.

6) Mælkesyre i 5 og 10% opløsning afkalker ret hurtigt og giver kun moderat skrumpning. Kerner er godt bevarede og farvningen er god.

7) Fosforsyre i 2½–10% opløsninger afkalker på nogenlunde samme tid som mælkesyre, viser godt fixerede celler og virker ikke væsentligt skrumpende. Farvbarheden er særdeles god og skærbarheden er meget god, således at fosforsyren kan anbefales.

8) Citronsyren afkalker på omtrent samme tid som fosforsyren. Cellerne synes noget mere skrumpede, farvningen er god.

9) Eddikesyren i 10% mættet kogsaltopløsning afkalker i forhold til de lige nævnte syrer på kortere tid, men der kommer større skrumpning, og syren er ikke så god som fosforsyren.

10) Svovlsyrlingen overgår alle de nævnte metoder. Dens overraskende store opløsende evne overfor fosforsur kalk skulle bero på, at svovlsyrlingen med det uopløselige trikalciumfosfat dannede det let opløselige monocalciumfosfat efter formlen:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 4\,SO_2 + 4\,H_2O = Ca(H_2PO_4)_2 + 2\,Ca(HSO_5)_2$$

Den afkalker i løbet af 1–2 dage, fuldstændigt ensartet. Efter skylning i rindende vand i 24 timer er alle farvninger fortræffelige. Hvis det er nødvendigt med ophold i syren længere end 8 dage, går det ud over den finere cellestruktur.

Colqhoun (1900) omtaler under sine forsøg på at demonstrere knoglekanalerne, at han afkalkede med en blanding af myresyre og ferrosulfat, efter at have behandlet fåretibiae med guldkloridopløsning i håb om at få en finere farvning end med sølvnitrat.

I *Szymonowizc's* »Lehrbuch der Histologie« (1901) findes intet nyt. Under afkalkning er kun omtalt to metoder: Salpetersyre i vandig eller alkoholisk opløsning og saltsyre anvendt i meget tynde opløsninger eller i *v. Ebners* kogsalt-saltsyreblanding.

Først 1902 fremkom en større systematisk undersøgelse af afkalkningen, *Schaffers* arbejde: »Versuche mit Entkalkungsflüssigkeiten«. Udgangspunktet for *Schaffers* undersøgelser var: Med større exactheed end tidligere at fastslå, hvilke metoder (anvendt på knoglevæv fra dyr), der opløste kalksaltene hurtigst, samtidigt med at den skadelige indflydelse på vævene var så ringe som muligt. Da afkalkning kun var muligt ved hjælp af syrer, var det mest naturligt at prøve virkningen

af forskellige syrer i forskellige koncentrationer på vævene. *Schaffers* forsøg gik væsentligst i tre retninger:

1) Hvilke syrer eller syreblandinger, der havde den største afkalkende evne.
2) Hvilken indflydelse øver rene syrer eller syreblandinger på rent kollagent væv (senevæv).
3) Hvorledes forholder det rene kollagene væv sig ved forskellige forsøg på at fjerne syren.

De to sidste spørgsmål var inspirerede af undersøgelser af *Pfleiderer* og *Zachariades*. Den førstnævnte havde offentliggjort nogle undersøgelser over syrers kvældende virkning på fibrin, visende at den kvældende virkning hos syrerne i høj grad var afhængig af syrernes aciditet, men også i høj grad af disses koncentration. Undersøgelserne gjaldt især salpetersyrens, saltsyrens, fosforsyrens, eddikesyrens og mælkesyrens forhold. *Zachariades* beskæftigede sig med senevævs forhold til forskellige koncentrationer af salpetersyre. Han kom blandt andet til den slutning, at de forskellige virkninger af syrerne afhænger af antallet af syremolekyler i samme volumen.

Enkelthederne i *Schaffers* undersøgelser vil blive omtalt senere, men det skal lige nævnes, at han foretog undersøgelser over mange forskellige syrer i forskellige koncentrationer og kombinationer. Først og fremmest anvendtes salpetersyre, men desuden saltsyre, svovlsyrling, eddikesyre, trikloreddikesyre, fosforsyre, mælke- og myresyre, i vandige og alkoholiske opløsninger. Kun ved bestemmelsen af knogleaskens opløselighed anvendte han ækvimolære opløsninger af syrerne (i forhold til 5% salpetersyre), ellers var styrkeangivelserne af syrerne procentiske.

Resultatet af *Schaffers* forsøg var, at man må stille en række fordringer til syrerne som afkalkningsvædske:

1) De må ikke fremkalde kvældning af det limgivende væv.
2) De skal besidde en stor opløsningsevne- og hastighed overfor kalksaltene.
3) De må ikke fremkalde udfældninger i vævsstykket, der afkalkes, og skal uden væsentlige kvældninger kunne fjernes herfra.

Af disse grunde kan forfatteren ikke anbefale fosfor-, mælke-, myre- og eddikesyre, der også i stærke koncentrationer fremkalder kvældninger. Desuden har disse syrer ingen stor opløsningshastighed eller opløsningsevne overfor kalksaltene. Dog tilføjes det, at man kan anvende den afkalkende virkning af de to sidstnævnte syrer, når præparaterne på forhånd er behandlet i kvældningshæmmende midler (f. eks. formalin). Til større stykker kan anvendes saltsyre, salpetersyre, trikloreddikesyre og svovlsyrling, hvor aktiviteten er aftagende i den nævnte rækkefølge. Trikloreddikesyre og især svovlsyrling bevirker kvældning af det limgivende væv, dog ikke efter forudgående formalinbehandling.

Den stærkeste virkning har ubetinget saltsyre og salpetersyre. For saltsyrens vedkommende anføres, at kromatinets farvbarhed lider, hvorfor forfatteren foretrækker salpetersyren, bl. a. også fordi salpetersyren gælder for at være mere skånende end saltsyren overfor kerne- og cellestrukturer.

Salpetersyren anbefaledes i 2–10% vandige opløsninger. Afkalkningen foregik hurtigere i *Thomas* vandhjul. Afkalkningen hæmmedes i høj grad, når man som opløsningsmiddel anvendte alkohol. Forskellige tilsætninger: Floroglucin, forma-

lin og lign. virkede hæmmende på afkalkningsprocessen, uden at forfatteren kunne konstatere nogen beskyttende virkning.

I *Krauses* »Encyklopädie der mikroskopischen Technik« fra 1903 er afsnittet om afkalkning skrevet af *Schaffer* og rummer udover det lige citerede intet nyt. Under afsnittet om høreorganets histologiske præparation anbefaledes fremdeles metoder, der i forhold til *Schaffers* afsnit må forekomme forældede: 0,5% kromsyre, koncentreret pikrinsyre, 3,5% salpetersyre i alkohol og 3–5% vandig trikloreddikesyreopløsning.

Stöhr's »Lehrbuch der Histologie« fra 1905 svarer fuldstændigt til *Schaffers* afsnit i *Krauses:* »Encyklopädie«, ligesom *Schaffers* undersøgelser for en stor del citeres i *Schmorls:* »Untersuchungsmethoden« fra 1909. Her er der af forfatteren gjort selvstændige iagttagelser. Angående salpetersyreblandinger har *Schmorl* fundet, at floroglucinmetoden ganske vist gav en hurtig afkalkning, men til gengæld en uanvendelig farvbarhed. Alkoholiske blandinger afkalkede meget langsomt, og når det drejede sig om større stykker, fik man overhovedet ingen afkalkning, selv om man lod syrerne virke længe. *Müllers* opløsning fandt forfatteren kun anvendelig til meget unge knogler, specielt ved forskningen af rachitis og medfødt syfilis. Trikloreddikesyren, 5% vandig opløsning, kan anvendes efter fixation med kvældningshæmmende midler. Efter afkalkningen omhyggelig udvaskning i rindende vand i 24–48 timer. Alle farvemetoder lykkes udmærket.

Om myresyren anfører *Schmorl*, at den anvendt på godt fixerede præparater giver udmærkede resultater, specielt er farvbarheden bevaret som ved ingen andre afkalkningsmetoder, måske med undtagelse af Müllers vædske. Den anvendes i 20–25% opløsning, modsat *Schaffer*, der anvendte den i koncentreret (ca. 85%) opløsning. Herved skulle den virke hurtigere samt mindre kvældende. Skylning i vand skulle bevirke meget stærk kvældning. Der anbefaledes derfor skylning i alkohol, hvorunder det betonedes, at metoden på denne måde blev kostbar.

I den følgende tid, ja helt op til vore dage, fremkom der intet principielt nyt om afkalkningen. Dette genspejler sig i de forskellige tekniske håndbøger i histologi, som allesammen i afsnittene om afkalkning i større eller mindre grad bygger på erfaringer, der er gjort af *Busch*, *Haug*, *Schaffer* og *Ziegler*. Således er der næsten ingen forskel på førsteudgaven fra 1903 og sidsteudgaven fra 1926 af *Krauses:* »Encyklopädie der Histologie« udover forskel i typografien. Det samme gælder til en vis grad *Schmorls*, *Stöhrs* og *Romeis'* tekniske håndbøger, men allertydeligst afspejles forholdet i *Lee's* »The Microtomist's Vademecum«, hvor afkalkningen er beskrevet i udgaven fra 1928 næsten på samme måde som i udgaven fra 1885. I løbet af 43 år er der øjensynlig ikke sket noget af betydning på afkalkningens område.

Dette forhold svarer til *Jaffes* udtalelser i 1929.

Samtlige afkalkningsmetoder fra de senere år går alle ud på at virke så lidt beskadigende som muligt overfor det organiske væv, selv om vejene hertil er forskellige og tildels i strid med hinanden.

I *Langerons* »Precis de microscopie« (1934) omtales, at anvendelsen af salpetersyre og svovlsyre nu kun frembyder historisk interesse, idet myresyren og trikloreddikesyren afkalker med lige så stor energi og samtidigt bevirker, at vævene bliver meget smukkere. Samme tendens viser sig i *McClungs* »Handbook of

Microscopical Technique« (1929), idet denne anfører, at myresyre må foretrækkes frem for alle andre metoder, når det gælder om at blødgøre store mængder knogle. Samme bog rummer et nyt princip i afkalkningen, afkalkning i neutral opløsning. Metoden beroede på opløseligheden af tertiært kalciumfosfat i vand ved nærværelse af magniumcitrat. Ved senere efterprøvning har metoden vist sig at svigte, hvad den lovede *(Lorch)*. Det samme gælder *Whites* metode, som blev offentliggjort i 1923. Også denne anvendte neutral vædske i stedet for syre. Princippet var, at en opløsning af ammoniumcitrat havde evne til at opløse uopløselige salte af calcium (fosfat, karbonat og sulfat), selv når opløsningen var neutral eller alkalisk med overskud af ammoniak.

Shelling & Halpherson (1928) finder ikke brugen af syrer ønskelig, og da de under andre undersøgelser tilfældigt havde fundet, at citrater havde affinitet til kalk under dannelse af let opløseligt, dissociabelt kalciumcitrat, fik det forfatterne til at prøve natriumcitrat som afkalkningsmiddel. Vædsken bestod af 100 cc. 10% formalin og 20 gram natriumcitrat. Den angaves at fremkalde hurtig afkalkning og samtidigt at være fixerende. Imidlertid virkede denne vædske efter *Jaffe* langsommere end Müllers vædske, så nogen større praktisk betydning kan man næppe tillægge metoden.

Wilson (1934) anfører, at brugen af stærke syrer til afkalkning sædvanligvis betragtes som ugunstigt på grund af disses tendens til at forårsage svulst af vævet og ødelæggelse af kernefarvningen. Kernefarvningen bliver ikke selektiv og vævene uden kontrast ved kontrafarvningen. Fortyndinger af syrerne med formol eller alkohol forlænger blot afkalkningsprocessen, således at det bliver simplere at anvende myresyre eller Müllers vædske. Imidlertid mener forfatteren det muligt at anvende 20% salpetersyre, uden at der kommer svulst af vævet, og uden at det går ud over kernefarvningen, samtidig med at afkalkningen er overstået på kort tid. Princippet i forfatterens metode er præliminær fjernelse af fedtet i knoglevævet og en derpå følgende afkalkning i salpetersyre i vakuum, hvorved den dannede kulsyre skulle være i stand til hurtigere at undvige. Affedtningen fandt sted ved hjælp af alkohol-æter og ren æter. Metoden skulle give gode resultater med alle rutinefarvemetoder. Imidlertid har *Lillie* (1944) efterprøvet metoden og fundet, at den hverken i tinktoriel henseende eller i henseende til afkalkningstid holdt, hvad den lovede. I virkeligheden var den ikke bedre end 5% salpetersyre eller 25% myresyre. Heller ikke ved anvendelse af vakuum på 25% myresyre fandtes nogen nævneværdig nedsættelse i afkalkningstiden.

En afkalkningsmetode, som hviler på et nyt princip, er den af *Lindahl* (1935) anførte. Metoden er væsentligst beregnet på afkalkning af zoologiske objekter (forskellige former for havdyr- alger, svampe o. l.), der var særligt righoldige på kalciumkarbonat. Ved afkalkning med de mest anvendte syrer udvikledes rigelige mængder CO_2, resulterende i sprængning af de meget fine texturer. Til afkalkningen anvendtes kulsyre, idet kulsyren opløstes i vand under et tryk på 3 atm. I et specielt apparat lededes den kulsyreholdige vædske ned over den genstand, som skulle afkalkes, idet der herved dannedes et mere opløseligt bicarbonat af det uopløselige karbonat. Til afkalkning i almindelighed er metoden for langsom og kræver frem for alt et specielt apparatur, hvori der indgår en glasflaske med indsmeltet hane, rummende 10 l, og i stand til at tåle et tryk på 3 atm.

McNamara, Murphy & Gore (1940) har med held anvendt samtidig fixation og afkalkning med følgende blanding:

Alkohol 95%	50 cc
Formalin	40 -
Salpetersyre	5 -
Merkuriklorid	10 g
Trikloreddikesyre	30 g
Dest. vand	400 cc

Vædsken skulle anvendes i rigelig mængde. Der afkalkedes ved 37° og metoden skulle tillade de almindelige farvemetoder. Hvis afkalkningen strakte sig ud over 7 dage, blev kernefarvningen dog ødelagt.

Kolin (1942) anførte 5% kemisk ren iseddike, som ved knoglestykker af en tykkelse på 2–5 mm skulle afkalke på ca. 24 timer. Forfatteren pointerede, at det var af den yderste vigtighed at anvende iseddike for at opnå en skarp nukleær farvning, for at blødgøre hårde væv og for at hindre opsvulmning.

I tiden fra 1930 til 1945 er der fra amerikansk side fire gange omtalt en afkalkningsmetode ved hjælp af en blanding af myresyre og natriumcitrat. Metoden er første gang beskrevet af *Evans & Krajian* (1930), der anvendte en blanding af lige dele 85% myresyre og 20% natriumcitrat efter forudgående fixation med formalin. Anvendt samtidig med salpetersyre viste det sig, at metodens mest fremtrædende egenskaber var, at de cellulære elementer var uafficerede, og at de tog imod farve lige så godt som væv, der ikke havde været underkastet afkalkning. Salpetersyre gav dårlig nukleær farvning. At *Jaffe* i sit arbejde fra 1929 fandt myresyren utilfredsstillende, mener *Evans & Krajian* skyldes, at han ikke har anvendt citrat.

Wagoner (1931) anvendte en teknik bestående i fixation i *Müllers* vædske i 10 dage og savning i tynde snit på ca. 5 mm. Derpå fornyet fixation i 10 dage. Afkalkning i:

1) Salpetersyre, 5% vandig opløsning, eller
2) myresyrecitrat, bestående af lige dele 50% vandig myresyre og 20% vandig natriumcitrat.

I farveteknisk henseende fremhævede *Wagoner* de samme fordele fremfor salpetersyre som *Evans & Krajian.*

Custer's metode var den samme som *Evans & Krajians.* Afkalkningsvædsken havde en pH (første gang man støder på begrebet i forbindelse med afkalkning!) på 1,68. Decalcineringen tog på tynde skiver af spongiøst knoglevæv (knoglemarv) af nogle millimeters tykkelse 2–4 timer. Metoden anvendtes herhjemme af *Narald Gormsen* ved undersøgelser af knoglemarven. Om metoden anførtes, at alle farvemetoder, også azur-eosinfarvningen, gav gode resultater.

Endelig er denne metode i 1945 omtalt af *Anna Morse* ved undersøgelser af histologiske snit af tænder siddende i alveolerne. Afkalkningsvædsken bestod af 90% myresyre blandet med lige dele 20% natriumcitratopløsning. Afkalkningen tog 3–4 døgn ved anvendelse på kæber af rotter. Iøvrigt omtaler forfatteren vigtigheden af en god fixation, idet den efterfølgende behandling i allerhøjeste grad kan influere på det primære fixationsbillede. Desuden hævder forf., at anvendel-

sen af stærke syrer som salpetersyre gør cytologiske studier på et hvilket som helst materiale tvivlsomme. Endelig omtaler forfatteren, at overafkalkning med denne metode skulle være så godt som udelukket.

I et cytokemisk arbejde fra 1945 af *Hamberger & Hyden* er der anført en metode, som imidlertid kun er anvendt på meget små stykker knoglevæv, nemlig udpræparerede cochleae fra marsvin. Afkalkningsvædsken var 20% iseddikesyre, som var 0,05 molær med hensyn til lantanacetat. Det essentielle i metoden skulle være, at man ved tilsætning af lantanacetat opnåede en fældning af kernernes nukleinsyrekomponenter, således at disse bedre tålte afkalkningen.

Endelig har *C. M. Plum & J. J. Pindborg* i 1946 offentliggjort en hurtigmetode til afkalkning af tænder, hvor afkalkningstiden varierer fra 2 til 3 døgn. Afkalkningsvædsken, der består af 20 g 5% ferriammoniumsulfat og 500 g 5% salpetersyre, er en modifikation af en vædske, tidligere angivet af *Okkels* under dennes arbejder med afkalkning. Princippet i metoden er, at man ved tilsætning af metalsalte giver vædsken et saltoverskud, hvorved det skulle være muligt at bevare forekomst af disse salte i det afkalkede væv.

Af større systematiske undersøgelser over afkalkningen har der siden *Schaffers* arbejde i 1902 kun været tre i de senere år *(Jaffe*, 1929, *Murayama*, 1937, og *Lillie*, 1944*)*. Kun hovedlinierne i disse arbejder vil blive ridset op, medens detaillerne vil blive nøjere omtalt under de afsnit, de har relation til. *Jaffe* omtaler først afkalkningens problemer: Om man skal anvende uorganiske eller organiske syrer, syrernes indflydelse på bindevævsstrukturen og kernefarvbarheden og den indledende behandling af de væv, som skal afkalkes, specielt fixationen. Jaffe inddeler afkalkningsvædskerne i mere og mindre vigtige afkalkningsvædsker, hvor han til de første regner: Müllers vædske, salpetersyre og saltsyre, og til de sidste regner: Myresyre, kromsyre og kromsyreblandinger, eddikesyre, mælkesyre, fosforsyre, pikrinsyre, svovlsyrling,trikloreddikesyre og natriumcitrat. Om den sidste udtalte forfatteren, at den afkalkede langsommere end Müllers vædske. *Jaffe* er den første, der har anført, at afkalkning foregår hurtigere ved anvendelse af en temperatur på 37°. Dette forhold er omtalt af *Plum & Pindborg* og gjort til genstand for udstrakt undersøgelse af *Murayama*. Sidstnævnte forfatter pointerer, at vævenes farvbarhed lider ved ophold i syrer. Han efterlyser derfor en metode til nøjagtig bestemmelse af afkalkningens slutpunkt. Til forsøgene anvendtes 2,5 og 5% salpetersyre, 5 og 10% trikloreddikesyre, 25% myresyre og 5% sulfosalicylsyre, allesammen fremstillet med 10% formalin. Til sammenligning af afkalkningshastigheden anvendtes en bestemt mængde af hver opløsning. Vævsstykker af så vidt mulig samme størrelse blev anbragt i vædskerne og der blev dagligt foretaget bestemmelse af den opløste Ca-mængde. Dette er første gang Ca-analyser er taget i brug ved undersøgelser over afkalkningen. Som objekt for afkalkningen anvendtes 6-8 mm tykke stykker af den midterste del af humerus med rød marv fra et voksent lig med leukæmi, ribbensstykker fra menneske (5–6 mm lange), 2–3 mm tykke slibesnit af præmolarer og 3 mm tykke femurstykker, ligeledes fra menneske. Til undersøgelsen af farvbarhed er anvendt hæmatoxylin-eosin og Azan.

En særlig skånsom metode er angivet af *Lorch* (1946) bestående i en stødpudeopløsning med pH på 4,5. Den fremstilles inden brugen ved blanding af:

A. 21 g kryst. citronsyre + 200 cc NaoH fyldt op til 1 liter med aq. dest.
B. 1/10 n HCl.

Der tages 30 cc opl. B og 70 cc opløsning A og tilsættes 5 dråber 1% zincsulfat.

At denne metode er skånsom forstås bedst ved, at forf. efter afkalkning af knoglevæv var i stand til at påvise fosfatase. Der er den ulempe ved metoden, at den kun er anvendelig på meget små knoglestykker (op til ½ cm^2 på objektglasset).

Lillie (1944) udtaler, at problemet hurtig og tilfredsstillende afkalkning samtidig med en tilfredsstillende Romanowskyfarvning af knoglemarven fremdeles er vanskeligt. I denne anledning har forf. tidligere foretaget nogle ikke publicerede undersøgelser over 5% myresyre som afkalkningsmiddel og herved fundet denne tilfredsstillende. I den originale studie blev der foretaget et overblik over effekten af afkalkning i varierende perioder på Romanowsky-farvningen af knoglemarv fra de lange rørknogler. Selv så kort behandling som 1 døgn i 5% salpetersyre og 1–2 døgn i 5% svovlsyrling kompromitterede marvfarvningen alvorligt, idet der kom diffus oxyfili af kerner og protoplasma. Behandling af marven med følgende rutinevædsker:

1) Myresyre, koncentreret, gram 25 + 10 g natriumcitrat + 75 cc vand.
2) 5–6% svovlsyrling med citronsyre og natriumfosfatstødpude med pH på 2,2, 3,0, 4,0, 5,0 og 6,0.
3) ca. 6% NH_4NO_3 (ækv. m. 5% salpetersyre) og
4) ca. 15% NH_4Cl (ækv. m. 10% saltsyre),

tillod excellente marvfarvninger efter indlejring og skæring. Idet forfatterens mening er, at man ved at kontrollere den initiale pH kan kontrollere beskadigelsen af marvfarvningen, blev der i denne forsøgsrække fremstillet serier af puffede blandinger af svovlsyrling og myresyre. Kaninknoglemarv blev anbragt i disse i forskellige tidsrum, blev derefter vasket og farvet efter Romanowsky-metoden. Resultaterne af disse undersøgelser gav anledning til nye forsøgsrækker, hvor der anvendtes myresyre-citratblandinger og forskellige puffede blandinger af myresyre, svovlsyrling og trikloreddikesyre ved stuetemperatur og 37°. Desuden anvendtes forskellige opløsninger af eddikesyre, svovlsyrling og ren myresyre i forskellige koncentrationer samt alkoholiske opløsninger af myresyre, eddikesyre og salicylsyre. Forfatterens konklusioner var følgende: Langsomme afkalkninger kan foretages af decorticeret, spongiøs knogle med ammoniumklorid eller -nitrat, men er der corticalis er metoden altfor langsom.

Puffet natrium-citrat-myresyre med initial pH på over 3,0 afkalker knogle med corticalis langsomt og tillader god Romanowsky-farvning.

Puffet myresyre med initial pH på omkring 2,5 er hurtigere, men viser mere tendens til at kompromittere marvfarvningen og er i almindelighed ikke bedre end den 5% vandige opløsning, som anbefales i håndbogen af samme forfatter (1947).

Eddikesyren er et relativt utilstrækkeligt afkalkningsmiddel uden sikkerhedsmargin mellem adækvat afkalkning og kompromitteren af kromatinfarvningen.

Trikloreddikesyre er en god afkalkningsvædske, men der skal mere til, og den er dyrere end myresyre.

Salpetersyre og svovlsyrling afkalker prompte, men den første ødelægger Romanowsky-farvningen lige så prompte og den anden tenderer til det samme, især hvis afkalkningen tager 2 døgn eller mere.

Med en 5% myresyre skal der anvendes 40 cc pr. g knogle til fuldstændig afkalkning.

80% alkoholblandinger af myresyre, eddikesyre og salicylsyre afkalker ikke, et forhold som ligeledes gælder Carnoyvædske.

Anvendelse af vakuum er ikke nogen større fordel, undtagen til at fjerne bobler i større eksemplarer.

Ved denne gennemgang af afkalkningsmetoder fremgår det, at følgende forhold ved selve afkalkningen eller i forbindelse med denne er af kapital interesse:

1) Ad afkalkningen:
   - a) afkalkende medier (syrer og salte)
   - b) styrken af afkalkende medier
   - c) tilsætning til afkalkende medier for om muligt at nedsætte disses vævsødelæggende virkninger
   - d) de afkalkende mediers vædskefase (vandige eller alkoholiske opløsninger)
   - e) afkalkningstiden, og i tilslutning hertil
   - f) temperaturens indflydelse
   - g) afkalkningens slutpunkt
   - h) overafkalkning

2) I forbindelse med afkalkningen:
   - a) fixation og anden forbehandling (hærdning og lign.)
   - b) efterbehandling
   - c) kvældning og skrumpning
   - d) indlejring
   - e) vævenes farvbarhed
   - f) egnede farvemetoder

Endelig er følgende forhold i tilslutning til afkalkningen af en vis interesse:
   - a) anbringelse af vævet under afkalkningen
   - b) mængden af afkalkningsvædske
   - c) skiftning af afkalkningsvædsken
   - d) bevægelse under afkalkningen
   - e) affedtning
   - f) over- og undertryk.

Forøvrigt fremgår det af denne gennemgang af afkalkningsmetoderne, at der findes forholdsvis lidt litteratur om dette emne i forhold til den betydning, afkalkningen tillægges. Specielt er det yderst sparsomt, hvad der findes af systematiske undersøgelser om emnet, selv i den nyere tid, hvor man dog har været i stand til at undersøge afkalkningen kemisk og biokemisk. Meget betegnende for, hvad der vides om afkalkning er, at de større håndbøger i histologi viser en udpræget lighed i deres afsnit om afkalkning i bøgernes førsteudgave i forhold til de sidste udgaver, til trods for tidsforskelle på indtil et halvt hundrede år. Eneste forskel er i virkeligheden typografien. Desuden er det karakteristisk både for

håndbøgerne og de forskellige oversigtsarbejder om afkalkningen, at det er *Busch's*, *Haug's*, *Ziegler's* og *Schaffers* erfaringer, der går igen med lidt modifikationer i for- og efterbehandling, i syrekoncentrationer og i syreblandinger.

Et område som farvbarheden efter afkalkningen er trods dets øjensynlige vigtighed stedmoderligt behandlet. Kun i enkelte tilfælde foreligger omtale af de efter afkalkningen anvendte farvemetoder. I de fleste tilfælde står kun omtalt præparaternes farvekvalitet, men ikke hvilke farvninger, det drejer sig om. Endelig er i andre arbejder farvbarheden slet ikke nævnt. De anvendte farvemetoder er uden undtagelse regressive, d. v. s. farvemetoder, hvorved vævene overfarves og derpå differentieres (befris for overskud af farve med syre). Denne fremgangsmåde kan medføre en ret væsentlig fejlkilde i bedømmelsen af farveresultaterne. Kun i eet arbejde er der foretaget en systematisk undersøgelse af afkalkningsvædskernes pH *(Lillie)*. Ingen har foretaget en kontinuerlig undersøgelse af pH under afkalkningen for at få et begreb om afkalkningsprocessens forløb. Temperaturundersøgelser er kun foretaget af *Murayama*, *Suzuki & Itoh*. Røntgenundersøgelser over afkalknings afslutning er nok blevet anbefalet af *Hagens*, *Alexander & Fischer* og af *Schmorl*, men aldrig anvendt til systematisk undersøgelse af afkalkningens forløb eller til bestemmelse af afkalkningstiden for forskellige brintionholdige vædsker (væsentligst syrer, men også opløsninger af sure salte, der fraspalter tilstrækkeligt med brintioner til at kunne afkalke).

Sidst og ikke mindst er hidtil alle sammenlignende undersøgelser over diverse syrers afkalkningstider blevet udført med opløsninger af ret vilkårlig procentisk sammensætning, og kun eet sted i litteraturen findes omtalt anvendelsen af opløsninger af syrer, som var ækvimolære med en 5^{0}_{0} salpetersyre. Det er i *Schaffers* store arbejde fra 1902, hvor det viser sig, at *Schaffer* har følelsen af, at man skal arbejde med ækvimolære opløsninger af syrerne til sammenligningsbrug. Han gennemfører det dog ikke ved sine øvrige undersøgelser over afkalkningen.

Anvendelse af normale syreopløsninger ved sammenlignende undersøgelser over afkalkende effekt i forbindelse med farvbarhed efter afkalkning findes ikke tidligere omtalt.

Det var herefter indlysende, at mine undersøgelser måtte omfatte forsøg over følgende faktorer i afkalkningsprocesserne:

1) Tidsfaktoren
2) Temperaturfaktoren
3) Syrestyrkefaktoren

Forsøgene skulle foretages på ensartede objekter med farvekontrol på ens objekter efter anvendelse af en progressiv farvemetode, for at udelukke fejlkilder som følge af subjektivitet ved den ellers nødvendige differentiering.

Desuden fandtes det nødvendigt at foretage undersøgelse over for- og efterbehandlingens indflydelse på det histologiske billede.

KAPITEL II

TEKNIK VED UNDERSØGELSER AF AFKALKNINGEN OG AF FORHOLD AF BETYDNING I TILSLUTNING TIL AFKALKNINGEN

A. Tidligere systematiske undersøgelser

Som tidligere omtalt er antallet af systematiske undersøgelser meget ringe, idet der i løbet af de sidste 80 år kun er fremkommet ialt 5 sådanne arbejder (*Boettcher: 1869*, *Ziegler: 1899*, *Schaffer: 1902*, *Murayama: 1937* og *Lillie: 1944*).

Omend ønskværdigheden af en god fixation er fremhævet i så godt som alle arbejder vedrørende afkalkningen finder dette forhold kun omtale i *Boettchers* og *Zieglers* arbejder. I *Boettchers* arbejde »Über Entwicklung und Bau des Gehörlabyrinths nach Untersuchungen an Säugethieren« omtales, at dyrene kun undtagelsesvis blev fixerede i Müllers vædske, inden hovederne blev afkalkede, idet forfatteren fandt, at en omgående afkalkning af høreorganet i almindelighed var den bedste! Forfatteren havde forsøgt fixation med palladiumklorid og alkohol før afkalkningen, men ikke set nogen nytte heraf. Først efter afkalkningen foretoges hærdning i Müllers vædske! *Ziegler* pointerede indledningsvis betydningen af en god fixering, og syntes, at en 4% vandig opløsning af formalin var andre fixationsmidler, specielt sublimat og Carnoy, overlegne.

Ingen af arbejderne indeholder nogen redegørelse for, hvordan forfatterne er kommet til de refererede resultater, og endnu mindre for, hvordan forholdet fixation – afkalkning er undersøgt.

For at få nøjere holdepunkter for afkalkningens forløb har alle de ovennævnte forfattere anvendt forsøg med forskellige slags knoglevæv. Kun *Schaffer* har anvendt nøjere definerede knoglestykker ved sine undersøgelser. Han anvendte til bestemmelsen af afkalkningstider for forskellige syrer og syreblandinger tilnærmelsesvis lige store, kileformede stykker knogle, savet ud af Müller-fixerede menneskecalcanei. Desuden anvendte han så vidt muligt lige lange (20 mm) og lige tykke elfenbensstifter, hvis vægt varierede fra 0,432–0,416 g, og hvor afvigelsen i vægt ikke oversteg 0,016 g. Tykkelsen var omkring 4 mm, men kunne svinge med godt 2 10 mm. *Boettcher* undersøgte afkalkningen på labyrinther fra nyfødte dyr, ældre hunde og katte. *Ziegler* anvendte humeri fra udvoksede marsvin, idet der af knoglerne blev skåret længdesnit. Der blev ikke angivet noget om dimensionerne af disse knoglestykker. Samme mangel gør sig gældende i *Lillies* arbejde, hvor der kun angives, at undersøgelserne er foretagne dels med mere solide knogler (?), dels med abefemora (stykker med bevaret corticalis og stykker be-

stående af substantia compacta) og dels med stykker af sternum. *Murayama & al.* anvendte ribben, femora, humeri og tænder fra menneske samt tørret femur fra hunde. De anvendte tænder var præmolarer og incisiver, der blev slebet ned til henholdsvis 2–3 mm og 1,5 mm. Ribbenene blev i nogle af forsøgene savet i stykker på 5–6 mm tykkelse. Om de øvrige knoglestykker angaves, at de i de enkelte forsøgsrækker var så vidt muligt lige store.

Hvad angår tidsregistreringen er denne:

Dage: *Murayama & al., Boettcher*
½ døgn: *Ziegler, Lillie*
Timer: *Schaffer*

Med andre ord har kun Schaffer fulgt afkalkningsprocesserne nøjere, medens de øvrige har nøjedes med grove skøn over afkalkningstiden for de enkelte syrer.

De eneste, der har haft en mulighed for at udtale sig om afkalkningsprocessernes forløb er *Murayama & al.*, idet disse har foretaget daglige analyser af indholdet af calcium ved skiftningen af afkalkningsvædskerne. Tabel I er i så henseende meget illustrerende:

Tabel I

Kopi af tabel I (side 100) i Murayama & al.

Tage	Mittlere Temper.	2.5 % ig. Salpetersäure	10 % ig. Trichlor-essigsäure	25 % ig. Ameisensäure	5 % ig. Sulfosalizyl-säure
1	27.2	24.8	34.4	32.5	17.6
2	22.9	19.1	18.8	16.3	12.7
3	22.2	14.3	13.4	9.6	11.1
4	25.8	14.6	11.7	7.5	9.5
5	26.8	12.0	10.2	7.1	8.1
6	27.7	7.6	6.0	4.6	5.9
7	28.5	4.5	3.7	4.1	5.5
8	28.9	2.2	1.5	4.1	6.0
9	28.7	0.9	0.3	2.8	4.4
10	29.6	0	0	2.5	3.6
11	28.3			2.5	3.8
12	25.9			1.7	2.5
13	29.2			1.5	2.0
14	29.5			1.3	1.8
15	29.1			0.9	1.6
16	29.1			0.6	1.2
17	29.7			0.3	0.7
18	29.4			0.2	0.4
19	27.8			0.1	0.2
20	27.4			0	0.1
21	27.2				0.03
22	26.2				0
Totale Ca-Menge (mg)		961.6	851.0	867.8	774.6

Af tabellen fremgår, at afkalkningsprocessen for de fire syrer forløber ret ensartet, omend med forskellig hastighed. Forløbet er ret brat til at begynde med

for derefter at aftage jævnt, således at den sidste del af en tænkt afkalkningskurve bliver meget flad, især for de mere langsomt afkalkende syrers vedkommende.

Iøvrigt viser tabellen tydeligt, at der må have været en ikke ringe vægtforskel på de »så vidt muligt lige store stykker«, idet de totale mængder calcium i hvert stykke humerus viser afvigelser på indtil 200 mg, ensbetydende med en afvigelse på ca. 22% i forhold til det stykke, der indeholder mest calcium. Sådant forhold virker uheldigt i en sammenlignende undersøgelse over forskellige syrers afkalkningstider.

Afkalkningens slutpunkt er som nævnt af *Murayama & al.* bestemt ved analyse af Ca-indholdet i afkalkningsvædskerne. Slutpunktet er regnet lig første dag, hvor der ikke længere optræder målelige mængder.

Schaffer bestemte afkalkningens slutpunkt ved indstik i knoglevævet af en tynd insektnål, idet han samtidig angav, at man i enkelte tilfælde ved elfenbensstifterne med det blotte øje kunne følge afkalkningen. Til at begynde med sås afsmalning langs randen, der kontrasterede mod den axiale, hvide kerne af uafkalket knoglevæv. Denne kerne forsvandt ved fuldstændig afkalkning. Dette fænomen iagttoges ved afkalkning med alkoholiske syreblandinger og fosforsyre.

Hverken *Boettcher*, *Lillie* eller *Ziegler* har angivet noget om anvendte kriterier for den afsluttede afkalkning, men det må formodes, at fremgangsmåden har været lig den af *Schaffer* anvendte: En prøve med stik eller skæren i de afkalkede væv.

Angående det afkalkende princips art og styrke anfører *Boettcher:* Anvendelse af 1% kromsyre ved mindre kalkholdige labyrinther, medens der ved mere kalkholdige labyrinther anvendtes 5% og 10% saltsyre. Endvidere forsøgtes fosforsyre, mælkesyre og citronsyre (de procentiske styrker ikke angivne), men med dårligt resultat.

Ziegler har anvendt:

1) Kromsyre og dens salte: Müllers vædske – 2% kromsyre-kromsalpetersyre (kromsyre: 1 del, salpetersyre: 1–5 dele; vand, 100 dele).
2) Den af *Ranvier* anbefalede pikrinsyre.
3) Træeddike.
4) Saltsyre; 1–10% opløsninger og v. Ebners kogsalt-saltssyreblanding.
5) Salpetersyre: 3–9% vandige opløsninger, 5% salpetersyre sammen med mættet kogsaltopløsning i lige dele 95% alkohol, *Thomas* salpetersyre-alkohol samt den af *Andeer* og *Haug* anbefalede floroglucin-salpetersyre.
6) Mælkesyre i 5 og 10% opløsninger.
7) Fosforsyre i 2½, 5 og 10% opløsninger.
8) Citronsyre (Styrke ikke opgivet).
9) Eddikesyre, 10% opløsning i mættet kogsaltopløsning.
10) Svovlsyrling (Styrken ikke angivet), hvor der i den ledsagende støkiometriske ligning: $Ca_3(PO_4)_2 + 4\ SO_2 + 4\ H_2O = Ca(H_2PO_4)_2 + 2\ Ca(HSO_5)_2$, i hvert tilfælde må skulle stå $2\ Ca(HSO_3)_2$ på højre side af ligningen.

Schaffer har i sine forsøg anvendt:

1) Salpetersyre: 5%, 10% og 20% vandig opløsning, 5% alkoholisk i 75% og i 96% alkohol, alkoholisk salpetersyre-floroglucin efter *Haug* og det samme i vandig opløsning, 10% salpetersyre i kalialun (5%), formolsalpetersyre.

2) 5% svovlsyrling, efter *Ziegler*.
3) Eddikesyre (vægtfylde 1,06) med lige dele mættet kogsaltopløsning.
4) Trikloreddikesyre, 5% efter *Partsch*.
5) Koncentreret fosforsyre.
6) *V. Ebners* kogsalt-saltsyreblanding.

Endvidere har forfatteren under sine forsøg over kvældning eller skrumpning af senevæv anvendt 65%, 10%, 6,5%, 5%, 3,25%, 1,5% og 0,65% vandig salpetersyreopløsning, koncentreret myresyre og 10% fosforsyre.

Murayama & aliena har brugt:

1) 10 og 20% salpetersyre
2) 5 og 10% trikloreddikesyre
3) 25% myresyre, og
4) 5% sulfosalicylsyre, således at alle de nævnte syrer er fremstillede med tilsætning af formalin, 10%.

Lillies undersøgelser har været koncentrerede om studier over Romanowsky-farvningen af knoglemarv efter dennes ophold i forskellig tid i forskellige afkalkningsvædsker. Sideløbende hermed er der dog også foretaget registrering af afkalkningstiden for disse vædsker. Følgende vædsker anvendtes:

1) 5% salpetersyre i vandig opløsning.
2) 5–6% SO_2 (mættet opløsning af svovldioxyd) enten alene eller i stødpudeblanding med citronsyre og sekundært natriumfosfat (pH fra 2,2 til 6,0).
3) 6,35% NH_4NO_3 (ækv. med 5% salpetersyre) } initial pH 5,1
4) 14,65% NH_4Cl (ækv. med 10% saltsyre). }
5) Myresyre: 90%, 4–25%, myresyre-natriumcitratblandinger med varierende pH (heriblandt den af *Evans & Kraijan* angivne modifikation), samt blandinger af myresyre med sekundært og tertiært natriumfosfat med initiale pH-værdier fra 1,8 til 2,65.
6) Primært kaliumfosfat (KH_2PO_4) med initial pH på 5,0.
7) Rene og puffede opløsninger af eddikesyre.
8) Opløsninger af 25% myresyre, 25% eddikesyre og 10–20% salicylsyre i 80% alkohol samt *Carnoys* vædske.
9) 5% trikloreddikesyre.

I forbindelse hermed kan det nævnes, at forfatteren også gennemprøvede *Wilsons* hurtigmetode bestående i afkalkning med 20% salpetersyre i vakuum med det resultat, at metoden ikke holdt, hvad den lovede.

Sidstnævnte arbejde er det eneste, som ved undersøgelse af afkalkningsprocesserne og deres indflydelse på vævenes farvbarhed tager hensyn til brintioneksponenten, trods det såvel kolorimetriske som elektrometriske metoder til bestemmelse af denne har været kendt de sidste par årtier.

I endnu højere grad må det undre, at der ikke ved disse sammenlignende undersøgelser over forskellige syrers afkalkende effekt er foretaget en sammenligning mellem ækvivalente syreopløsninger. Dette har sin betydning, da de syrer, der i almindelighed er genstand for undersøgelse, kan være både een-, to eller flersyrede syrer.

Schaffer har gjort et tilløb i den rigtige retning, idet han for at bestemme de enkelte syrers opløsningsevne overfor knoglesalte, anstillede følgende forsøgsrække over forskellige syrers evne til at opløse knogleaske. Syrerne var ækvimolekylære med 5% salpetersyre. Et par af beregningerne er ikke helt korrekte, og det fremgår, at der ikke er taget hensyn til forskellen i antallet af syrebrintatomer i de forskellige syremolekyler.

Tabel II

Kopi af tabel VII (side 327 i Schaffer)

No.	Gewicht der in 100 cc. zur Wirkung gelangten Säure	Gewicht der Knochenasche in g		Anmerkung
		welches noch gelöst wird	bei welchem die Sättigung eintritt	
31	5 HNO_3	4.5	4.6	
32	2.89 HCl	4.8	4.9	
33	7.77 H_3PO_4	5.0	5.1	
34	12.95 $C_2HCl_3O_2$	4.4	4.5	
35	6.51 H_2SO_3	Löst 0.3 g Knochenasche ziemlich rasch, aber in 6 stunden nicht vollständig. Nach längerem Stehen (20 Stunden) fällt ein reichlicher lockerer, flockiger Niederschlag aus, der in Wasser leicht löslich ist		
36	7.14 $C_3H_6O_3$	0.68	0.73	
37	3.65 CH_2O_2	0.37	0.39	
38	4.76 $C_2H_4O_2$	0.08	0.09	
39	5 HNO_3 in 95 procentigem Alkohol	—	0.8	Der ungelöste Rückstand zeigt in allen drei Fällen ein flockiges Aussehen
40	5 HNO_3 in 70 procentigem Alkohol	—	2.05	
41	5 HNO_3 in 50 procentigem Alkohol	—	3.56	

Temperaturens indflydelse på afkalkningen er kun undersøgt af *Murayama & aliena*, som blandt andet på 5–6 mm tykke stykker af menneskeribben foretog forsøg over afkalkningstiden med 5% salpetersyre og trikloreddikesyre (30 cc vædske) ved stuetemperatur, sammenlignet med stykker, der afkalkedes i termostat ved temperaturer fra 30 til 60 grader (intervaller på 5 grader).

Lillie nævner lige anvendelsen af en temperatur af 37° ved forsøg med myresyre-citratblandinger, men kun med henblik på den efterfølgende farvekvalitet af præparaterne, slet ikke med henblik på temperaturens eventuelle indflydelse på afkalkningshastigheden.

Systematiske undersøgelser over kvældninger eller skrumpninger af det afkalkede knoglevæv er kun foretaget af *Schaffer*. Hertil anvendte denne de før omtalte elfenbensstifter, hvor der ved hjælp af en dækglasmåler foretoges målinger af tykkelsen af stifterne før og efter behandlingen med de forskellige syrer. Desuden foretoges målinger efter efterbehandling med opløsninger af kogsalt, kalialun og andet, samt efter behandling med rindende vand. Når det makroskopisk

var tydeligt, registreredes desuden forkortning af stifterne. *Ziegler* omtaler nok kvældning og skrumpning, men ikke hvordan han når til disse resultater.

Ved undersøgelse af farvbarheden har *Lillie*, *Boettcher* og *Murayama & aliena* anvendt de væv, der er blevet afkalkede, hvilket vil sige henholdsvis knoglemarv, labyrinther og knoglemarv + celler.

De anvendte farvemetoder har for *Boettchers* vedkommende været guldsalte, carmin og salpetersur rosanilin, for *Zieglers* og *Murayama & al.s* vedkommende hæmatoxylin samt for *Lillies* vedkommende Romanowsky-farvningen. *Schaffer* har kun taget hensyn til knogle-sene og bruskvævs størrelsesvariationer, medens der ikke er taget hensyn til de forskellige syrers indflydelse på farvbarheden.

B. Andre tidligere undersøgelser

Da mange af de øvrige afkalkningsarbejder indeholder tekniske detailler af værdi, er en gennemgang af disse arbejder efter ovenstående retningslinier også nødvendig efter følgende skema:

Skema I

Skema over teknikken ved afkalkning

Forbehandling

Fixation.
Hærdning.

Afkalkning

Syreart og -styrke.
[Afkalkningstid — herunder forhold, der øger afkalkningshastigheden]:

Skiftning af vædskerne
Bevægelse af vædskerne
Temperatur af vædskerne
Ophængning i vædskerne
Affedtning af knoglevævet
Afkalkning i vacuum
(Afkalkning under overtryk)
[(Afkalkning ved elektrolyse)]

Bestemmelse af afkalkningens slutpunkt
[Overafkalkning]

Efterbehandling

[Behandling med reagenser, der hindrer kvældning og skrumpning].
Indlejring.
Farvning — herunder:

Farvede vævsarter
Farvemetoder
Farveresultater

De i [] indrammede punkter vil blive behandlede under: Egne undersøgelser i de tilsvarende afdelinger.

1. Fixation

I så godt som alle arbejder vedrørende det indre øres histologiske teknik og i en del arbejder omhandlende afkalkning i almindelighed *(Herxheimer, Lang & Hasslhofer, Langeron, Mallory & Wright, Romeis, Stöhr og Williams)* pointeres betydningen af en god fixation inden vævene underkastes en afkalkning. Kun

Katz, *Ranvier*, *McNamara*, *Murphy & Gore* og til en vis grad *Krause* og *Herxheimer* udtaler, at en foregående fixation ikke er nødvendig, når afkalkningsmidlet samtidigt virker som fixativ (enten rene syrer som f. eks. 15% salpetersyre anført af *Krause* og *Katz*, eller syrer tilsat et fixativ som f. eks. salpetersyre tilsat formol, som angivet af *McNamara*, *Murphy & Gore* og *Herxheimer* eller den af *Ranvier* anbefalede myresyre med tilsætning af 1–2% guldklorid). Med undtagelse af *Boettcher* går ingen så vidt som til at anføre, at der ikke ses nogen nytte af anvendelsen af palladiumklorid eller alkohol før afkalkningen.

Selv om vigtigheden af fixationen inden afkalkningen er pointeret i de fleste arbejder, er det kun de færreste, der udtaler sig om årsagen hertil. *Herxheimer* anfører direkte, at formol er bedre egnet end alkohol, sublimat eller osmiumsyre, da sidstnævnte ikke hindrer stærk kvældning af bindevæv. *Politzer* anfører, at fixationen er nødvendig for at fremstille celleformer og cellestrukturer skarpt, medens *Werner* i overensstemmelse med, hvad der nu er alment anerkendt anfører, at fixationen har til opgave så vidt muligt at bibeholde celler og væv i den vitale tilstand og samtidig hindre grovere forandringer ved de følgende procedurer (afkalkning og indlejring).

Ingen af arbejderne indeholder undersøgelser eller iagttagelser over den følgende afkalknings indflydelse på ensartede væv, behandlet med forskellige fixativa, i håb om at finde det fixationsmiddel, der bedst hindrer de i tilslutning til afkalkningen optrædende forandringer.

En oversigt over de anvendte fixationsmidler til mere specielle ørehistologiske formål og til mere almene histologiske formål ved behandlingen af hårde væv (knogle- og tandvæv) findes i arbejder af *Alexander & Fischer*, *Krause*, *Politzer*, *Romeis* og *Werner*. Til yderligere orientering er disse fixationsmidler stillet op i følgende skema:

Skema II

Oversigt over anvendte fixativa i tilslutning til afkalkningsmetoder

			Ved afkalkning i almindelighed	Ved afkalkning af det indre øre
Sublimat	Sublimat		Ziegler	
	Müller	m. formol	Bauer, Brinch, Støhr, Weidenreich, Schmorl	Hoessli, Manasse, Juul & Vraa-Jensen
		u. formol	Wagoner, Strelzoff	Alexander & Fischer, Boettcher, Bøhm & v. Davidoff, Hensen, Loewenberg, Schwartze
	Regaud		Williams	
	Held			Alexander & Fischer (komb. m. Wittmaacks vædske)
	Helly		Weidenreich	
	Zenker		Jaffe, Mallory	Eschweiler, Krause, Meitzner, Saxén, Shambough
	Orth		Mallory & Wright	Alexander & Fischer
	Susa			Alexander & Fischer, Juul & Vraa-Jensen, Mygind & al., Solovtzoff, v. Fieandt & Saxén

		Ved afkalkning i almindelighed	Ved afkalkning af det indre øre
Krom	Kromsyre	Støhr (0.25—2 %), Zagelmeier (m. osmiumsyre og eddikesyre), Ziegler (komb. m. iseddike og osmiumsyre = Flemmings vædske)	Flesch, Katz (komb. m. eddikesyre, kromsyre og platinklorid), Nuel (1 %), Krause, Kuhn (¼ %), Loewenberg, Politzer (0.1—1 %), Pritchard (¼ %), Ranvier (2 %)
	Kaliumbikromat	Busch (1 % + 0.1 % kromsyre), Lee(do), Stricker	Alexander & Fischer, Kolmer, Nuel, Loewenberg, Politzer, Retzius, Tafani
	Wittmaack		Alexander & Fischer, Juul & Vraa-Jensen, Kristensen, Mygind & al. Møbius, Saxén, Takezawa, Wada, Werner, Wittmaack, Yoshii
Formalin	Formalin 4 %	Kolin, Plum & Pindborg, Romeis, Weidenreich, Williams, Ziegler	
	Formalin 10 %	Mc. Clung, Ewans & Krajian, Herxheimer, Jaffe, Kelemen, Langeron, Linddahl, Morse, Wilson	Alexander & Fischer, Covell Manasse, Saxén
Alkohol	Alkohol	Jaffe, Lee (95 %), Lorch (80 %), Mallory & Wright, Stricker	Eschweiler
	Carnoy	Ziegler	Hamberger & Hydén, Juul & Vraa-Jensen
Osmium	Osmiumsyre	Ziegler	Politzer, Alexander & Fischer Bøhm & v. Davidoff, Flesch, Moseley, Nuel, Loewenberg, Waldeyer
Metalsalte	Guldklorid		Alexander & Fischer, Politzer, Ranvier
	Sølvnitrat		Waldeyer
	Palladiumklorid, 1 %		Boettcher, Gottstein, Hensen, Waldeyer

I tilslutning til denne oversigt skal det lige som kuriosum nævnes, at *Stricker* i sin håndbog (1871) anfører, at man foruden med alkohol kan hærde knoglevæv ved kogning med en blanding af vand, 8 dele, kreosot, 1 del og iseddike, 1 del!!!

Af skemaet ses det, at der ved arbejder over det indre øre i højere grad er lagt vægt på god fixation end tilfældet er med arbejder om afkalkning i almindelighed. Dette forhold hænger sammen med det indre øres sarthed i forhold til andre organer.

Endvidere fremgår det, at man ved afkalkningsstudier i almindelighed i overvejende grad har foretrukket at arbejde med formalin i 4–10% vandige opløsninger, omend også sublimatholdige fixationsvædsker, i særdeleshed Müllers vædske, har fundet en ikke ringe anvendelse.

I ørehistologiske arbejder har sublimatholdige vædsker også fundet en ikke ringe anvendelse, væsentligst i form af Müllers vædske og Susa (også kaldet *Heidenhains* vædske). Indenfor dette område er det ellers kromholdige fixativa og osmiumsyre, der dominerer. Sidstnævnte findes så godt som udelukkende omtalt i ældre arbejder (fra før århundredskiftet), og blev en overgang ifølge *Werner* kaldt høreorganets klassiske fixationsmiddel. Da der imidlertid er mange ulemper ved osmiumsyren i anvendelse (den er kostbar, den diffunderer langsomt, den irriterer øjen- og næseslimhinderne og den fordamper let), er den nu helt forladt indenfor ørehistologien. Anvendelsen af kaliumbikromat i rene opløsninger og af kromsyren hører nu også fortiden til, men til gengæld har kaliumbikromat-iseddike-formolholdige vædsker efterhånden vundet en meget stor udbredelse indenfor den experimentelle forskning af det indre øre. Specielt nyder *Wittmaacks* vædske (Kaformacet) stor udbredelse.

Sammenlignende undersøgelser over, hvilket fixationsmiddel, man med størst fordel anvender, er kun foretaget af *Ziegler*, *Werner*, *Mygind & al.*, og af *Juul & Vraa-Jensen*, hvor førstnævnte udtaler, at en 4% vandig formalin er bedre end sublimat og Carnoy's vædske, i det mindste ved større stykker, idet sublimat ikke diffunderer særligt hurtigt ind. Det samme gælder *Flemmings* vædske (Kromeddike-osmiumsyreblanding) og osmiumsyre. *Werner* har på frølabyrinthen gennemprøvet 20 forskellige fixationsvædsker og fundet, at Kaformacet gav de bedste vævsbilleder. Iøvrigt får man ikke noget at vide om, hvilke fixationsopløsninger, det drejer sig om. Endelig har *Juul & Vraa-Jensen* i anledning af nogle experimentel-histologiske undersøgelser over det indre øres påvirkning af ascaridol foretaget experimenter med forskellige fixationsvædsker: Carnoy's vædske, Bouin's vædske, formol-Müller's vædske »Susa« og Wittmaacks vædske. De sidste to vædsker syntes at give de bedste resultater. I modsætning til *Mygind og medarbejdere* fandt de ingen slående forskelle i det histologiske billede opnået med sidstnævnte to fixativer.

Juul & Vraa-Jensen har desuden undersøgt det histologiske billede ved efterfixation varende fra 24 timer til 7 dage. Det fremgik, at den lange fixationstid ikke ydede nogen særlig fordel i forhold til den kortere. *Alexander & Fischer* fandt, at den histologiske farvbarhed led ved for længe ophold af vævene i fixationsvædskerne, forholdsvis mindst ved anvendelse af formalin eller formol-eddikesyre-blandingerne.

Hurtig fixation anbefaledes af *Thoma*. Hertil anvender han det af ham angivne vandhjul, hvori præparaterne ustandselig bevæges. Metoden anbefaledes af *Alexander & Fischer*. Sidstnævnte forfattere angiver opvarmning i termostat som en fremgangsmåde til at opnå endnu hurtigere fixation.

Frisk fixation, hvilket vil sige fixation så hurtigt som muligt efter døden, er anbefalet af *Brinch*, *Corti*, *Gottstein*, *Kuhn*, *Koelliker*, *Loewenberg* og *Manasse*. Skridtet tages først fuldt ud med *Becks*, *Kolmers* og *Yoshiis* indførelse af den intravitale fixation, bestående i at forsøgsdyrets blodsystem gennemskylles med saltvand for at fjerne blodvædsken. Derefter gennemskylles med fixationsvædsken. Metoden har spillet og spiller fremdeles en kolossal rolle ved experimentel-histologiske undersøgelser på mindre forsøgsdyr. Metoden er anvendt af *Williams* ved dennes studier over »Preparation of Combined Hard and Soft Tissues«, men

ellers anvendes metoden så langt overvejende til studier af høreorganet, og er blandt andet anvendt af *Chilow*, *Covell*, *Hoessli*, *Krause*, *Kristensen*, *Lagally*, *Mygind & medarbejdere*, *Møbius*, *Romeis*, *Shimodaira*, *Takezawa*, *Vraa-Jensen & Juul*, *Wada*, *Werner*, *Wittmaack* og *Zolovtzoff*.

En enkelt forfatter, *Wittmaack*, har indenfor det ørehistologiske område forsøgt at finde frem til en enhedsfixation, hvor der toges behørig hensyn til alle vævsformer, specielt nervevæv. Han stødte i lange tider på store vanskeligheder, men fandt, at man fik helt gode resultater ved anvendelse af en vædske, bestående af kaliumbikromat, formalin og iseddike. Denne vædske er senere blevet udformet til den tidligere omtalte og så meget anvendte Kaformacet. *Williams* går snarere imod tanken om en enhedsfixation, idet han anfører, at mange af de metoder, der anvendes med godt resultat i almindelighed, viser sig at være uanvendelige, når man har at gøre med vævskombinationer indeholdende knoglevæv. Sidstnævnte synspunkt er i overensstemmelse med den almindelige mening indenfor histologiske kredse, og genfindes i det lille og letoverskuelige arbejde af *Peter Gray*: »Notes on the Practice of Fixation for Animal Tissues«. Han stiller følgende krav til fixativets funktion:

1) Materialet skal bevares i den form, det havde inden fixationen.
2) De nukleære elementer i materialet skal bevares.
3) De cytologiske elementer i materialet skal bevares.

Angående den ydre form anføres, at kontraktion af dyret kan hindres af narkose. Iøvrigt findes der kun tre immobiliserende agentia af almindelig værdi:

1) En temperatur mellem 60 og 75°.
2) Osmiumsyre.
3) Blandinger af iseddike med krom og pikrinsyre.

Den første af disse faktorer kan anvendes på alle fixativer, men destruerer samtidig både cytologiske og histologiske detailler.

I embryologisk materiale fra pattedyr (noget af det, der mest lider under defiguration), bevares den ydre form bedst af opløsninger indeholdende formol og kaliumbikromat. Kaliumbikromat giver nogen skrumpning, medens formol frembringer nogen svulst af vævet, således at en kombination af disse to er indiceret ved meget sarte pattedyrvæv!

Bevarelsen af de nukleære detailler hænger oftest sammen med fixativets penetrationsevne. Det mest anvendte er iseddike, som har en stor penetrationsevne, hvilket også gælder æter-alkohol fixativer. Den defigurerende virkning hindres her af sublimat.

Bevarelsen af de cytologiske detailler er stort set et spørgsmål om den kemiske koagulation af relativt store masser af protoplasma — en koagulation, som tilvejebringes ved forskellige reagenser: Alkohol, forskellige kromholdige forbindelser, osmium, kviksølv og formalin. Valget af det anvendte fixativ afhænger af, hvad man specielt ønsker at bevare, og af hvilken effekt det valgte sandsynligvis udøver på objektets form og størrelse.

I oversigtsskemaet anfører *Gray*, at man ved ikke-kontraktile, fuldt narkotiserede dyr bør anvende *Helleys vædske*, når man vil bevare både formen og protoplasmatiske detailler.

Når man særligt ønsker en god kernefixation anbefales *Carnoy 1 og 2* samt *Carnoy-Lebrun.*

Endelig er det værd at lægge mærke til, at forfatteren som grundfixativer anfører:

1) Ren salpetersyre, 800 cc + 200 cc dest. vand
2) Iseddike
3) Kromsyre, 20 g; 100 cc dest. vand,

altså alle tre syrer med samtidig afkalkende effekt.

I sammenhæng med disse fixationsproblemer, vil det være naturligt lige at omtale Nissl-fixationen i korte træk, da Nissl-substansens fremstilling i det afkalkede præparat var een af hovedopgaverne. Det kan bedst stilles halvskematisk op, idet de anvendte fixativa efterfølges af de forfattere, der har anført brugen af vedkommende fixationsmiddel:

Formol: Bielschowsky, Cowdry, Delaney, Mott.
Alkohol: Bean, Bielschowsky, Cowdry.
Zenker: Cowdry, Delaney, Einarson.
Formol-Zenker: Delaney.
Iseddike-Zenker: Delaney, Einarson.
Bensley's vædske: Delaney.
Carnoy: Delaney, McClung.
Alkohol-krom-sublimat: Delaney.

Endelig har *Hopkins* under studiet af Nissl-substansens udseende i motoriske forhornsceller hos rotter fundet, at man ved tilsætning af 2, 5 til 10% iseddike til 100 dele 90% alkohol fik Nissl-legemerne meget skarpere begrænset end ved anvendelsen af 90% alkohol alene.

2. Hærdning.

Foruden den egentlige fixation findes i nogle ganske få arbejder, væsentligst af ældre dato *(Romeis, Strelzoff, Stricker, Stöhr* og *Manasse)*, angivet hærdning af vævene, inden den egentlige afkalkning. Hærdningen bestod i, at vævene anbragtes i varierende tidsrum i stigende koncentrationer af alkohol, for derpå atter at føres tilbage til vand. Metoden, der øjensynlig er fuldstændigt forladt, ser heller ikke ud til at have spillet nogen større rolle, især ikke efter indførelsen af fixationsmidler med høj penetrationsevne.

I et enkelt arbejde *(Hamberger & Hydén)* støder man imidlertid på et forhold af en vis interesse i denne sammenhæng, anvendelsen af lanthanacetat i forbindelse med afkalkning. Det drejer sig om cochleae fra marsvin, dræbt ved dekapitation. Efter fixation af sneglene i 1½ time i Carnoy's vædske foretoges afkalkningen i samme tidsrum med en opløsning, der var 0,05 molær med hensyn til lanthanacetat (Lanthan, et metal hørende til de sjældne jordarters metaller) og 20% med hensyn til eddikesyre. Forfatterne angav, at lanthanacetatet skulle bevirke en udfældning af nukleinsyrekomponenterne under den påfølgende afkalkning, hvorved cellestrukturerne bevaredes. Metoden var efterprøvet ved hjælp af de i arbejdet beskrevne cytokemiske undersøgelser.

3. Afkalkning.

a) *Syreart og -styrke:* En gennemgang af det store antal syrer, som i tidens løb har været anbefalet til afkalkning, eller en gennemgang af det utal af procentiske styrkeangivelser tillige med en opregning af de kombinationer, i hvilke forskellige stoffer er sat til syrerne, vil føre alt for vidt og er ganske formålsløst.

I stedet herfor har jeg valgt at opstille alle arbejder, der beskæftiger sig med syreart- og styrker i følgende ret omfattende skema, som foruden en inddeling i enkeltarbejder og samlearbejder (væsentligst håndbøger i histologisk teknik) også indeholder en inddeling i afkalkningsarbejder i almindelighed og i afkalkningsarbejder med relation til det indre øre.

Skema III

Oversigt over anvendte syrer og syrestyrker ved afkalkning i almindelighed

	Enkeltarbejder	Samlearbejder
5 % vandig salpetersyre	Bauer, Brinch, Kelemen, Schaffer, Wagoner, Weidenreich, Williams	Lang & Hasslhofer, Krause, Romeis, Jaffe
10 % salpetersyre	Støhr, Williams, Zagelmeier	Busch
20 % —	Wilson	
10 % alkoholisk salpetersyre	Thoma	Schmorl
Ukendt styrke	Strelzoff (cit. efter Busch)	Herxheimer
Conc. i 90 % alkohol	Støhr	
20 % HNO_3 + 5 % HCl	Hopewell-Schmith	
1/10 n HNO_3 + natriumcitrat	Lorch	
5 % HNO_3 + jernalun	Plum & Pindborg	
15 % HNO_3 + formol		Mallory & Wright, Schmorl
— — + floroglucin	Haug, Andeer	Mallory & Wright, Herxheimer, Romeis, Mc. Clung
1—10 % vandig salpetersyre		Szymonowizc, Haug
1—10 % alkoholisk salpetersyre		Mc. Clung
HNO_3 Müller (100:3)		Schmorl
8 % HCl + 10 % HCOOH	Richman, Gelfand & Hill	
Kogsalt-HCl i alkohol		Schmorl
v. Ebner kogsalt-HCl		Schmorl, Szymonowizc, Lang & Hasslhofer
½—1 % HCl		Szymonowizc
1/10 vol. HCl + palladiumklorid		Lee
Ukendt styrke HCl		Krause, Herxheimer, Busch, Romeis, Jaffe
0.5—10 % HCl		Haug, Mc. Clung
3 % alkoholisk HCl		Mc. Clung
1—10 % alkoholisk HCl		Mc. Clung
Svovlsyrling, 5 %	Ziegler	Schmorl, Lang & Hasslhofer, Herxheimer, Romeis, Jaffe, Mc. Clung, Mallory & Wright
Fosforsyre	Strelzoff (cit. efter Busch)	Krause (10 %). Uden styrke: Lee, Jaffe, Mc. Clung
Kromsyre	Thiersch (cit. efter Haug), 2 %	Haug (2 %), Lee (1 %), Krause (1 %)

	Enkeltarbejder	Samlearbejder
Müllers vædske	Pommer, Shelling & Halpherson	Schmorl, Lang & Hasslhofer, Herxheimer, Haug, Romeis, Jaffe, Mc. Clung
Natriumcitrat, 20 % + formol	Shelling & Halpherson	Jaffe
Ammoniumcitrat	White	
Eddikesyre	Kolin (5 %)	Lee, Krause, Busch, Jaffe (Ingen styrkeangivelse)
Kulsyre	Linddahl (3 atm. tryk)	
Trikloreddikesyre, 5 %	Langeron, Westin, Partsch	Schmorl, Mallory & Wright, Langeron, Lang & Hasslhofer, Krause, Herxheimer, Romeis, Jaffe, Mc. Clung
Trikloreddikesyre, 10 %	Kelemen	
— , 6 % - div.	Mc. Namara, Murphy & Gore	
Svovlsyre, ingen styrkeangivelse		Lee
Citronsyre, ingen styrke		Ziegler, Krause, Jaffe
Mælkesyre, ingen styrke		Lee, Krause, Busch, Mc. Clung
Pikrinsyre		Lee, Busch, Romeis, Schmorl
— , mættet vandig opl.		Lang & Hasslhofer, Krause, Herxheimer, Mc. Clung
Pikrinsvovlsyre		Busch
Myresyre, ingen styrkeangivelse	Lepkowski	
Myresyre + ferrosulfat	Colqhoun	
— , 50 % + 20 % Na-citrat	Wagoner, Morse	
Myresyre, 85 % + 20 % Na-citrat	Custer, Gormsen, Evans & Krajian	
Myresyre, 10 % + 8 % HCl	Richman, Gelfand & Hill	
— , 10 %	Kelemen	
— , 20—35 %		Schmorl, Langeron
— , concentreret		Herxheimer
— , conc., alkoholisk		Romeis
1—5 % myresyre, alkoholisk		Mc. Clung
Myresyre, formol, lige dele		Schmorl

Afkalkningsarbejder over det indre øre

	Enkeltarbejder	Samlearbejder
Salpetersyre, 5 % + formol	Forshufvud, Juul & Vraa-Jensen, Kristensen, Wada, Werner	Krause, Alexander & Fischer, Møbius, Politzer
Salpetersyre, vandig opl. (forsk. %)	Eschweiler (15), Manasse (10), Pritchard (1), Wittmaack (2)	Krause (3.5)
Salpetersyre, alkoholiske opl.	Hagens (1—2 %)	Krause (3.5), Alexander & Fischer (efter Thoma)
Salpetersyreformol (2—3 %)	Wittmaack	Krause, Alexander & Fischer
Conc. HNO_3 + 10 % formol	Mygind	

	Enkeltarbejder	Samlearbejder
HNO_3-floroglucin		Alexander & Fischer (vandig eller alkoholisk)
Saltsyre, ingen styrke	Reissner, Scarpa	
1/10 HCl + klorpalladium	Gottstein, Nuel	
Saltsyre, forsk. styrker	Hensen (5—10 %), Koelliker, Loewenberg (fortyndede)	
Saltsyre med floroglucin		Krause
v. Ebners HCl,NaCl-blanding		Alexander & Fischer
Svovlsyrling, 6 %	Saxén	
Kromsyre, $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{2}$ %	Ranvier, Flesch, Gottstein, Nuel, Moseley (+ H_2SO_4)	Krause (Waldeyer cit.), Politzer
Pikrinsyre, conc.		Krause, Alexander & Fischer, Politzer
Müllers vædske	Bøhm & v. Davidoff	Politzer
Myresyre + 2 % gulklorid	Ranvier	
— , conc.		Alexander & Fischer (efter Schaffer)
Trikloreddikesyre, 5 %	Juul & Vraa-Jensen, Saxén	Krause
Eddikesyre, 20 % + Lantanacetat	Hamberger & Hydén	

Det fremgår heraf med al tydelighed, hvor mange slags syrer, både organiske og uorganiske, der er blevet anvendt, i alle mulige styrker og sammensætninger, medens ikke eet arbejde indeholder opgivelse af syrekoncentration i molariteter eller normaliteter, hvilket vilde have gjort det lettere at sammenligne resultaterne. Ganske vist er det ikke umuligt at omregne fra de procentiske angivelser til molariteter eller normaliteter, når man kender de forskellige syrers molekylvægte og ved, hvor mange dissocierbare brintioner, de indeholder. Dog ville man herved få ubehagelige tal at arbejde med.

Iøvrigt synes det med al tydelighed at fremgå af tabellen, at afkalkningsmetoderne aldrig har været tilfredsstillende. I modsat fald ville der sikkert ikke findes så mange af dem. I forsøg på at komme væk fra syrer som afkalkningsmidler er der angivet forskellige afkalkende salte. Således har *Lillie* angivet ammoniumklorid og ammoniumnitrat (ikke opført i skemaet), men dels er disse salte sure (indeholder ligesom syrer H^+-ioner) og dels er deres afkalkende effekt ikke særlig stor. Noget lignende gælder den af *Lorch* angivne afkalkningsvædske bestående af:

A) 21 g kryst. citronsyre, 200 cc n NaOH, fyldt op til 1 liter med aq. dest.
B) 1/10 n HCl eller HNO_3

Inden brugen blandes 30 cc B og 70 cc A til en vædske med pH = 4,5, for en overvejende del bestående af natriumcitrat + citronsyre, afsvækket ved tilsætning af natronlud. *White* går eet skridt videre, idet han anvender en opløsning af citronsyre (mættet, vandig opløsning), der fortyndes i forholdet 1 : 10 med vand og derefter neutraliseres ved tilsætning af ammoniak. Den herved dannede ammoniumcitrat angaves at have evnen til at opløse uopløselige salte af calcium

(fosfat, karbonat og sulfat). *Shelling & Halpherson* har taget skridtet fuldt ud, idet disse forfattere som afkalkningsvædske anbefalede natriumcitrat, 20 g + 10% formalin, 100 cc. Ingen af de sidste to omtalte afkalkningsvædsker har dog nogen afkalkende evne af betydning ifølge *Lillies* og *Jaffes* undersøgelser.

Indenfor samlearbejderne om afkalkning i almindelighed nyder efter forfatternes antal at dømme trikloreddikesyre, svovlsyrling og salpetersyre i den nævnte rækkefølge størst anseelse. Af disse er trikloreddikesyren ret kostbar; desuden er den i øjeblikket næsten umulig at fremskaffe.

Indenfor arbejderne vedrørende det indre øre indtager salpetersyren i 5% vandig opløsning med eller uden tilsætning af formol den mest dominerende plads. Det er værd at lægge mærke til, at der er flere ældre afkalkningsvædsker repræsenterede i denne gruppe end i gruppen: Almindelig afkalkning, i overensstemmelse med, at det er anatomer med interesse for det indre øre og histologisk arbejdende otologer, der i størst udstrækning har interesseret sig for afkalkningsproblemerne på et tidligere tidspunkt. I mange tilfælde er vanskelighederne åbenbart fundet for store, visende sig ved, at man har foretaget undersøgelser på fostre eller embryoner, hvor afkalkning ikke var nødvendig. I højeste fald er foretaget afkalkning med de allersvageste midler *(Boettcher, Claudius, Haug, Hensen, Krause, Loewenberg, Pritchard, Reissner, Retzius, Solovtzoff* og *Waldeyer)*. Hvor det har drejet sig om tindingeben fra voksne eller udvoksede dyr har sidstnævnte forfattere foruden *Corti, Covell, Deiters, Hasse, Kuhn, Koelliker, Rüdinger, Schwartze, Voltolini, Werner* og *Wittmaack* set sig nødsaget til at foretage udpræparation af den hindede labyrinth.

Den allerstørste vanskelighed har øjensynligt undersøgelsen af nervevæv (og herunder Nissl-substansen) voldt. Så sent som 1934 angiver *Takezawa*, at Nissl-farvningen er foretaget uden foregående afkalkning, hvilket vil sige, at der også hos denne forfatter må have været tale om udpræparation af den hindede labyrinth. *Covell* (1936–38) uddissekerede den hindede labyrinth for at undersøge hårcellerne med metylenblåt.

I *Werners* »Das Labyrinth« (1940), det bedste og mest sammenfattende arbejde over det indre øre, står disse vanskeligheder ved undersøgelsen af nerveelementer helt godt beskrevet på side 78: »Auch die Nervenelemente verlangen spezifische Methoden, obgleich sie schon im Übersichtspräparat recht gut zur Anschauung gebracht werden«. Som hjælpemetode til fremstillingen af Nissl-substansen anfører *Werner* den af *Wittmaack* lancerede farvning med thioninblåt efter fixation med Kaformacet.

Iøvrigt skriver *Werner* længere nede på samme side: »Für die Darstellung der Achsenzylinder und marklosen Nervenfasern durch Silberimpregnation ist die Entkaltung soweit wie möglich zu vermeiden. Jedoch sollen die Methoden von *Saxén* auch an gewöhnlichen Präparaten ausgezeichneten Resultate geben«.

b. Afkalkningens slutpunkt: Selv om forbavsende få forfattere *(Busch, Herxheimer, Jaffe, Alexander, Fischer, Hagens, Schaffer* og *Wilson)* direkte har udtalt sig om faren, vævene udsættes for ved at blive i afkalkningsvædskerne ud over den for afkalkningen nødvendige tid, tyder antallet af forfattere, som har interesseret sig for afkalkningens afslutning på, at man i det store og hele har været

klar over denne risiko. De metoder, der har været anvendt og stadig anvendes hertil er opført i nedenstående skema:

Skema IV

Metoder til bestemmelse af afkalkningens slutpunkt

A: Fysiske	Mekaniske	Bøje	
		Stikke	
		Skære	
	Røntgen		
B: Kemiske, beroende på udfældning af	P	Molybdatmetoden	
	Ca	Sodametoden	
		Kaliludmetoden	
		Oxalatmetoden	

Bøje-, stikke-, skæremetoden anvendt af:

Alexander & Fischer, Brinch, Eschweiler, Herxheimer, Jaffe, Lang & Hasslhofer, Langeron, Mallory & Wright, Mc. Namary, Murphy & Gore, Manasse, Politzer, Romeis, Schaffer, Schmorl, Støhr, Szymonowizc, Wagoner, Wilson, Juul & Vraa-Jensen.

Den kemiske metode anvendt af:

1) Molybdatmetoden *(Hagens, Williams)*
2) Sodametoden *(Werner, Møbius)*
3) Kaliludmetoden *(Kristensen, Møbius, Saxén, Werner)*
4) Oxalatmetoden *(Morse, Murayama & al.)*

Røntgenmetoden anvendt af:

Hagens (Alexander & Fischer, Schmorl (Schede))

Langt den almindeligste prøve er den mekaniske, hvor vævets konsistens undersøges ved, om man kan bøje det, stikke eller skære i det. Prøverne er baseret på en undersøgelse af selve det væv, der senere skal indlejres og skæres og beror iøvrigt på en konsistensændring af knoglevævet, som ved fjernelsen af kalksaltene får en konsistens som bruskvæv. Det siger sig selv, at bøjeprøven er meget hårdhændet, og at det kun er de færreste væv, man kan byde denne prøve. Mere lemfældige er skære- og stikkeprøven, hvor man skærer i det afkalkede væv for at mærke sig, om det har den rette konsistens (tørt franskbrød – *Brinch*), eller om man kan stikke en fin, poleret nål gennem vævet. Ingen af metoderne er imidlertid, som påpeget af *Hagens* og *Kristensen* særlig gode, især hvis det drejer sig om at undersøge, hvorvidt et tindingeben er afkalket. Som man kunne vente er det labyrinthkapslen, der afkalkes sidst. Ved anvendelse af stikke- eller skæremetoden risikerer man enten at lædere de for undersøgelsen vigtigste væv, eller man får ikke afkalket nok, fordi man kun tør skære eller stikke overfladisk i vævet. Altså i begge tilfælde uheldigt for vævet.

De kemiske prøver er nok så tiltalende, alene i kraft af, at de foregår på afkalkningsvædsken, og dog er der som det ses af skemaet kun et relativt lille antal forfattere, der har anvendt sig af de fordele, denne metode byder. Molybdatmetoden beror på en udfældning af farvede forbindelser mellem molybdat og den ved afkalkningen frigjorte fosforsyre. Oxalat- og soda (natriumkarbonat) -me-

toden beror begge på kalciumoxalats og kalciumkarbonats overordentlig lille opløselighedsprodukt i neutrale eller basiske opløsninger, ligesom kaliludmetoden beror på et lille opløselighedsprodukt af kalciumhydroxyd. Ved den sidste prøve virker selve reagenset neutraliserende, ved de første to prøver må man forinden gøre prøven af afkalkningsvædsken ammoniakalsk, da der ellers ikke kommer nogen udfældning af kalksalte (Meget stort opløselighedsprodukt i sure opløsninger).

Ifølge *Hagens* er heller ikke de kemiske prøver så gode, da man i nogle tilfælde (ved fintfølende prøver) afbryder for sent, medens der i andre tilfælde godt kan findes ikke afkalkede partier, selv efter negativt udfald af prøven (Der er her væsentligst tænkt på molybdatprøverne).

Hagens forsøgte derfor til bestemmelsen af afkalkningens afslutning ved tindingeben at røntgenfotografere disse. Det var tidligere blevet foreslået, (bl. a. af *Alexander & Fischer* og *Schmorl)*, men øjensynligt ikke nogetsteds taget i anvendelse.

Resultatet af eksperimenterne blev, at røntgenstrålerne med det samme afslørede, om afkalkningen var fuldstændig eller ej. Til at begynde med fandtes knoglen tættere svarende til labyrinthen, der blev tilbage som et focus, for efterhånden at forsvinde. Til sidst kastede det fuldstændigt afkalkede væv kun en svag, ensartet, grålig skygge. Røntgenfundene stemte med skæringsfundene.

4. Indlejringsmetoder.

Siden *Duval* (1879) og *Schiefferdecker* (1882) indførte celloidinen i histologien har dette præparat indtaget en dominerende stilling i forhold til den af *Klebs* (1869) indførte paraffinmetode, en stilling, som det nedenfor anførte skema viser, celloidinen har bevaret.

Skema V

Oversigt over indlejringsmetoder

Celloidin:	*Bauer, Brinch, Herxheimer, Juul & Vraa-Jensen, Kristensen, Lang & Hasslhofer, Mallory & Wright, Mygind & al., Eschweiler, Hoessli, Krause, Manasse, Saxén, Schmorl, Støhr, Wada, Williams, Wittmaack og Yoshii.*
Paraffin:	*David, Fischer, Hamberger & Hydén, Kelemen, Plum & Pindborg, van der Stricht og Weidenreich.*
Begge dele:	*Kolin, Lindahl, Westin, Wilson, Møbius, Werner og Wittmaack, Alexander & Fischer, Solovtzoff, v. Fieandt & Saxén.*
Olie- og voksblandinger:	*Stricker, Waldeyer, Moseley.*
Hjernemasse:	*Boettcher.*
Rygmarv, hjerne:	*Gottstein, Kuhn.*
Gummi arabicum:	*Loewenberg, Pritchard, Ranvier, Hensen, Waldeyer.*
Gelatine:	*Werner.*

Oto-histologien var i begyndelsen henvist til at undersøge plukkepræparater enten i frisk tilstand (i humor aqueus, jodserum eller sukkeropløsninger) eller efter hærdning med arsensyre eller kromholdige præparater. Iøvrigt var man henvist til at undersøge præparaterne fra fladen.

Ved at sprøjte lim eller limglycerin *(Waldeyer, Ranvier, Hensen)*, ved at indlejre i olie-voksblandinger *(Stricker, Moseley* og *Waldeyer)* eller ved at indlejre i hjernemasse eller rygmarv med påfølgende hærdning i alkohol lykkedes det efterhånden at få helt pæne tværsnit gennem det *Cortiske* organ.

Paraffinen har aldrig spillet nogen større rolle i oto-histologien. *Boettcher* (1869) udtalte om paraffinen, at den ikke var brugbar, idet præparaterne blev forurenede, og at det ikke var muligt at fremstille tilstrækkeligt tynde og regelmæssige snit. Af histologisk arbejdende otologer har dette indlejringsmiddel kun været anvendt af *Kelemen* og *Hamberger*. Af *Werner* har det fået en rosende omtale, idet det skulle muliggøre en ringe snittykkelse og kortere varighed af indlejringen, men kun med anvendelsesmulighed overfor embryoner og isolerede labyrinthdele. Det har været anvendt af *Fischer*, der beskriver dets iøjnespringende fordele i forhold til celloidinen: Enorm tidsbesparelse, betydeligt tyndere snit, ikke nær så kostbart eller vanskeligt af fremskaffe. Forfatterens første forsøg med paraffin endte uden resultat, men senere fandt han resultater, som viste, at metoden kunne anvendes på voksne, gamle, børn og dyr. *Westin* har på tilsvarende måde indenfor det odontologiske område udtalt sig for paraffin og mod celloidin. Han fandt kun celloidin anvendelig, når det gjaldt om at få oversigtspræparater! Ellers fandt han celloidinindlejringen uegnet, idet man i almindelighed ikke kan skære snit under 10 my, mest almindeligt mellem 15–20 my, hvilket naturligvis er en ulempe ved studiet af finstrukturer i mikroskopet. Til disse strukturer er det bedre med ca. 10 my, endnu bedre med 5–7 my. Dette er kun muligt med paraffin.

I et mindre arbejde udtaler *Werner* om celloidinen, at denne metode er udmærket til præparater af mennesker, men utilfredsstillende for finere histo-pathologiske undersøgelser i dyreeksperimenter. Dels giver den ikke konstante resultater og dels skader den dækdannelserne. Forfatteren søger helt at undgå alkoholskrumpninger ved at indlejre i gelatine.

Flere forfattere har anført den kombinerede anvendelse af celloidin-paraffin, men kun få (bl. a. *Alexander & Fischer, v. Fieandt & Saxén, Solovtzoff*) har anvendt den, idet metoden som anført af *Alexander & Fischer* er meget omstændelig og tidrøvende.

Bortset fra ovenstående indvendinger er der iøvrigt næppe tvivl om celloidinens store betydning for de opdagelser, der er sket indenfor forskningen af det indre øre.

Celloidin er nitreret cellulose, opløst i æteralkohol. Den er i stand til at diffundere fuldstændigt ind i vævene og ved langsom og forsigtig inddampning i stand til at få konsistens som den afkalkede knogle uden at skrumpe væsentligt. Man skal gå meget langsomt og forsigtigt til værks. Vævene skal ved indlejringen være fuldstændigt vandfrie. Celloidinen, der anvendes i en tyndere, tykkere og meget tyk opløsning (2, 4, 8, evt. 16%) skal også være vandfri og opbevares, så luftens fugtighed ikke kan trænge ind. Selve indlejringen skal foregå i exsiccatorer, og man skal ved påhældning af ny celloidin hele tiden påse, at der ikke fremkommer

luftblærer. Sådanne kan ødelægge præparatet fuldstændigt, idet de små blærer ved æterdampenes indtrængen kan udvide sig betydeligt.

Indlejringen skal altså foregå langsomt, og varigheden af denne er for et os temporis fra marsvin af middel størrelse et par måneder.

Når celloidinen er blevet tilstrækkeligt fast, tages hele blokken ud af glasset, hvori indlejringen har fundet sted. Blokken skæres til, monteres på en klods af træ eller stabilit. Der skæres på mikrotom med meget skråtstillet kniv under bestandig fugten med 70% alkohol.

Såvel snit, der ikke straks farves, som blokkene må opbevares i 70% alkohol.

Hvis celloidinen på noget tidspunkt bliver udsat for luftens påvirkning, resulterer det i kolossale skrumpninger, der gør præparater såvel som snit aldeles uanvendelige.

5. Farveresultater efter afkalkning.

At den for afkalkningen nødvendige syrepåvirkning influerer på den senere farvning af det afkalkede væv, er hævet over enhver tvivl. Den drivende kraf. i alle afkalkningsundersøgelser er utvivlsomt at ville forbedre farveresultaternet Her findes også den dybere årsag til inddelingen i stærke og hurtigt arbejdende syrer, og skånsomt og langsomt arbejdende syrer. Denne inddeling er omtalt i indledningen af *Haugs*, *Jaffes*, *Krauses* og *Lang & Hasslhofers* arbejder, uden at nogle af disse forfattere dog tager standpunkt til, hvilken af disse metoder, der er at foretrække. I labyrintharbejderne er der som tidligere pointeret en tendens til anvendelse af svage syrer, men desforuden gør *Schmorl* sig til talsmand for anvendelse af sådanne ved alle afkalkningsarbejder. Stærke syrer er kun anbefalede af *Hopewell-Smith* og *Wilson*. Et mellemstandpunkt indtages af *Langeron*, *Lepkowski* og *Westin*, som anbefaler at afkalke med forholdsvis hurtigt og skånsomt virkende syrer (trikloreddikesyre og myresyre). Spørgsmålet farvbarhed i almindelighed og kromatinets farvbarhed i tilslutning til afkalkning findes belyst i følgende skema:

Skema VI

Farvbarhed og kromatin contra forskellige syrer

Nedsat farvbarhed i almindelighed	Salpetersyre	Evans & Krajian
	Saltsyre	Ziegler
	Kromsyre (2%)	Haug
	Alle syrer	Lang & Hasslhofer (find de bedste), Lillie (kontroller initial pH), Shelling & Halpherson
	Stærke syrer > fort.	Herxheimer
	Syre > neutral vædske	White, Shelling & Halpherson (anbefaler alle opl. af citrater)
	Vandig > alkohol. syre	Wilson, Thoma (det modsatte hævdes af Morse og Wagoner)
Nedsat farvbarhed af kromatin	Salpetersyre	Brinch
	Saltsyre	Krause, Jaffe, Alexander & Fischer
	Stærke syrer	Westin
	Org. < uorg. syrer	Jaffe

Efter skemaet er der almindelig enighed om, at de stærke syrer, salpetersyre og saltsyre er de mest deletære for farvningerne, stærke syrer mere end fortyndede, sure vædsker mere end neutrale vædsker og uorganiske syrer mere end organiske syrer. Hvad angår kromsyren er den efter *Haugs* udtalelser meget ødelæggende for alle farvninger, men efter *Moseley* er kromsyren det eneste rigtige at anvende. Om spørgsmålet vandige contra alkoholiske syreopløsninger er der heller ikke enighed, idet *Thoma* og *Wilson* hævder, at de vandige opløsninger (af salpetersyre) i højere grad virker nedsættende på farvbarheden end alkoholiske opløsninger, medens det stik modsatte hævdes af *Morse* og *Wagoner*. Da kun den ene af parterne kan have ret, må der hos den ene eller den anden (sandsynligvis *Wilson* og *Thoma*) være foretaget farveundersøgelser, som er vildledende.

I det hele taget savner man meget i de arbejder, som udtaler sig om farvbarheden, udtalelse om, hvilke kriterier, der er lagt til grund for de endelige bedømmelser. Man har i høj grad opfattelsen af, at der til grund for opgivne farveresultater kun ligger et skøn. I mange tilfælde er der end ikke skønnet over farvbarheden. Der står (se skemaet næste side) kun nævnt, hvilke farvemetoder der er brugt eller anbefales, men intet om metodernes brugbarhed:

Skema VII

Oversigt over farvemetoder og -resultater ved forskellige afkalkede væv

Resultater: [1]) Ikke anført. [2]) Godt. [3]) Slet.
[4]) Afhængig af afkalkningsmetoderne. [5]) Nogenlunde tilfredsstillende.

Afkalkede væv	Farvemetoder	Forfattere og farveresultater
Knoglevæv	Alle metoder	Wilson[5]), Ziegler[4]) (god ved H_2SO_3)
	Hæmatoxylin-eosin	Busch[3]), Kelemen[1]), Lee[1]), Murayana[4]) (god ved CCl_3COOH og HCOOH), Williams[1]), Zagelmeier[1])
	Hæmatoxylin-karmin	Strelzoff[2])
	Karmin	Busch[1]), van der Stricht[2])
	Jernhæmatoxylin	Wagoner[2])
Knoglemarv	Azur-eosin	Custer[2]), Gormsen[2]) (begge ved HCOOH-citrat)
	Romanowsky	Lillie[4]) (god ved HCOOH-citrat)
Forstenede havdyr	Hæmatoxylin	
Tænder	Hæmatoxylin	Lindahl[1])
	Jernhæmatoxylin	Westin[1])
	Mallory	Westin[1])
	May-Grünwald	Westin[1])
	Unna-Pappenheim	Westin[1])
		Brinch[1])

Afkalkede væv		Farvemetoder	Forfattere og farveresultater
Labyrinthen	Oversigt	Hæmatoxylin	Hoessli[1]), Kuhn[1]), Manasse[2]), Takezawa[1]), Wada[1]), Møbius[2]), Wittmaack[1]), Kristensen[2]), Yoshii[1])
		Jernhæmatoxylin	Hoessli[1]), Krause[1]), Kristensen[2]), Saxén[1]), Juul & Vraa-Jensen[1])
		Salpetersur rosanilin	Boettcher[2])
		Karmin (pikrokarmin)	Boettcher[2]), Corti[1]), Hasse[1]), Kuhn[1]), Manasse[2]), Pritchard[1]), Hensen[5])
		Guldklorid	Ranvier[2]), Retzius[2])
	Mitochondrier	Syre-fuksin-metylgrønt	Covell[5])
		Altmann-Kull	Saxén[1])
		— -Schridde	Alagna[5])
		Jernhæmatoxylin-v. Gieson	Saxén[3]), Yoshii[1])
		Fosforwolframsyre-hæmatoxylin	Saxén[3])
	Nissl-substans	Metylenblåt	Saxén[5])
		Thionin	Wittmaack[1]), Møbius[5])
		Antracenblåt	Juul & Vraa-Jensen[3]), Kristensen[5])
		Toluidinblåt	Juul & Vraa-Jensen[5]), Alexander & Fischer[5])
	Marvskeder	Weil	Juul & Vraa-Jensen[2])
		Benda-Spielmeyer	Kristensen[2])
		Kultschitzky-Wolters	Wittmaack[1]), Alexander & Fischer[5])
	Nervetråde	Sølvimpregnation	Saxén[2]), Juul & Vraa-Jensen[5]), Kristensen[5])

Man vil lægge mærke til, at kun meget få forfattere har indrømmet, at farvemetoder anvendt af dem har givet dårlige resultater, og lige så få har været så diplomatiske at lade farvbarheden afhænge af de anvendte syrer.

At de ældre farvemetoder (Rosanilin og karmin) giver gode resultater, kan ikke undre, når man ved, hvor massivt farvende disse stoffer er. Det samme gælder i udtalt grad jernhæmatoxylin og til en vis grad hæmatoxylin. Farveresultatet er for en væsentlig del afhængig af sufficient udvanding af syrerne. Når *Saxén* ikke synes om resultatet med jernhæmatoxylin, skyldes det udelukkende, at denne farve sværter alle mulige strukturer, så den ikke yder nogen større hjælp ved identifikation og bedømmelse af Nissl-granula. At man kan få gode resultater med de forskellige marvskedefarvninger undrer forsåvidt heller, som det også her drejer sig om farvning med jernhæmatoxyliner.

Helt anderledes stiller det sig ved farvninger af Nissl-substans, hvor der er anvendt de gængse Nissl-farvemetoder (metylenblåt, thionin toluidinblåt og antracenblåt). Her er resultaterne kun betinget gode, væsentligst som følge afkalkningen. Metoderne kan dog godt svigte på ikke afkalket væv.

Hvad angår sølvimprægnationen af nervetråde angiver *Saxén* godt resultat af sin metode, medens *Juul + Vraa-Jensen* og *Kristensen* kun finder nogenlunde tilfredsstillende resultater.

Det er værd at lægge mærke til, at farvningerne af knoglemarven med azur-eosin og Romanowsky-farvningen er angivet gode ved anvendelsen af myresyre-citrat *(Custer, Gormsen* og *Lillie)*. Om disse farvninger ved man, at de er ret sarte overfor syrepåvirkning, således at det i almindelighed ikke lykkes at farve knoglemarvspræparater, når disse forinden har været underkastet en afkalkning.

KAPITEL III

EGNE UNDERSØGELSER OVER AFKALKNING I ALMINDELIGHED (MODELFORSØG)

A. Fixation

Når man i histologien taler om fixation, tænker man i de allerfleste tilfælde på postmortel fixation. Denne består i at vævene anbringes i fixationsvædsken, efter at have mistet kontakten med den levende organisme. Metoden er i de fleste tilfælde tilstrækkelig, men hvor det drejer sig om delikate væv som det indre øre, kan man næsten ikke få fixeret hurtigt nok. De autolytiske forandringer foregår overordentligt hurtigt i det indre øre, særligt for det Cortiske organs vedkommende. Derfor er i dette arbejde så langt overvejende anvendt intravital fixation, men desuden er metoden anvendt for at undersøge, hvordan de enkelte væv reagerer overfor syrepåvirkninger efter at være fixeret optimalt, idet der må regnes med tilsvarende syrepåvirkninger overfor optimalt fixeret væv ved undersøgelser over det indre øre.

Metoden er indført af *Yoshii* (1909) og *Kolmer* (1912), hvor sidstnævnte anbefaler metoden til så store dyr, som metoden overhovedet kan gennemføres på, for at undgå postmortelle forandringer. Med samme begrundelse gør *Shambough*, *Werner* og *Yoshii* sig til talsmænd for metoden, om end *Werner* udtaler, at den postmortelle fixation uden tvivl kan give brugbare præparater. I så fald skal præparaterne gøres så små som muligt og alt unødvendigt væv skal fjernes. Herved risikerer man at lædere vævet, samt mister oversigten. *Werner* tilføjer, at den intravitale fixationsmetode afgjort er overlegen, men naturligvis kun ved rigtig udførelse. Også *Krause* (1903–26) anser den intravitale fixationsmetode som den bedste. Det samme gælder *Williams*. Metoden er iøvrigt anført af *Romeis* og anvendt af *Beck*, *Covell*, *Chilow*, *Falbe-Hansen*, *Hoessli*, *Juul & Vraa-Jensen*, *Kristensen*, *Lagally*, *Mygind*, *Saxén*, *Takezawa*, *Wada* og *Wittmaack*. *Mygind* har i eet af sine arbejder anført, at det i specielle tilfælde var bedre at anvende den postmortelle fixation, idet forfatteren i disse tilfælde foretrak en konstant fixation frem for en ideal fixation. *Yoshii* har foretaget en undersøgelse med det formål at finde ud af, hvilken af disse fixationsmetoder, der var bedst. *Yoshii* lavede to forsøgsrækker: I den ene foretog han decapitation med knoglesaks, åbnede bullae tympanicae og anbragte hovedet i fixationsvædsken. I den anden foretog han i kloroformnarkose gennemskylning med fixation. De histologiske præparater behandlet efter 1. metode viste i talrige tilfælde rigelige ansamlinger af afstødte,

rundagtige masser (hyaline kugler og plasmadråber) i og på det Cortiske organ. Endvidere fandtes kvældning af sanseepithelierne, bøjninger og hovedsagelig indsænkninger af membrana Reissneri, stillingsændringer af membrana tectoria med eller uden sammentrykning af det Cortiske organ. Ved den intravitale gennemskylning frembød præparaterne et ensartet og regelmæssigt billede, hvor den Cortiske membran er horizontal, den Reissnerske membran er udspændt lige mellem sine tilhæftningssteder, og der ingen hyaline kugler er. Vigtig er god bevarelse af gangliecellerne. Forfatterens slutord er da også, at han altid har anvendt denne metode.

Min teknik er den samme som angivet af *Eckert Møbius*, *Cl. F. Werner* og *Falbe-Hansen*, og jeg har som disse forfattere ikke anvendt den af *Yoshii*, *Beck* og *Chilow* angivne teknik med samtidig kunstig respiration under fixationsgennemskylningen.

Teknikken var i korte træk følgende:

I æternarkose opskæring af huden i midtlinien fra abdomen til halsen, forsigtig gennemklipning af brystbenet i hele dettes udstrækning, hvorefter brystvæggen holdtes til side. Ved hjælp af saks og pincet åbnedes perikardiet ved apex, hvorefter perikardiet krængedes op omkring afgangen af de store kar. Venstre ventrikel åbnedes ved et klip nær apex, derpå indførtes en glaskanyle langs med septum ventriculorum, indtil kanylen, der endte knopformet, lå i aorta ascendens. Gennemskylningen kunne begynde, efter at der var klippet hul på højre hjertekammer. Gennemskylningen fortsattes til skyllevandet var næsten klart, og foretoges med fysiologisk saltvand, indeholdende 6% gummi arabicum (ligevægt med blodets kolloider).

Gennemskylningen foretoges med livsvarme vædsker og med et tryk på ca. 70 cm vandsøjle ved hjælp af en opstilling af Mariottes flasker.

Efter afsluttet gennemskylningsfixation isoleredes hovederne så skånsomt og hurtigt som muligt, hvorpå de anbragtes til efterfixation i noget af den ved gennemskylningen anvendte fixationsvædske.

B. Vurdering af fixationen

(Modelforsøg I, II, III, IV, V, VI, VII)

1. Postmortel fixation

Efter det foran nævnte om den postmortelle fixation contra den intravitale fixation er der ikke gjort meget ud af den postmortelle fixationsmetode i mine undersøgelser. Det allerførste modelforsøg (no. 1) foretoges dog efter postmortel fixation, idet nyre, hjerne og lever fjernedes fra to æternarkotiserede marsvin*). Vævene anbragtes 1 døgn i Kaformacet, hærdedes i 70% alkohol 1 døgn, skylledes i rindende vand 1 døgn og blev skåret i skiver, der anvendtes dels til kontrolvæv overfor de syrebehandlede stykker, dels anvendtes som kontrol for syrepåvirkningen i forskellige afkalkningsvædsker. De ikke syrebehandlede kontrolvæv sammenlignedes i sammenligningsmikroskop med tilsvarende behandlede vævsstykker fra modelforsøg no. II.

a) *Farvning med Bøhmers hæmatoxylin:* Viste at farvningen var bedre i de post-

*) Dræbt ved nakkegennemklipning.

mortelt fixerede kontrolpræparater, idet farvningen af de intravitalt fixerede kontrolpræparater, især kernerne, var meget svag.

b) *Farvning med Weigerts hæmatoxylin:* Viste tilsvarende forhold. I morfologisk henseende fandtes imidlertid i de intravitalt fixerede vævssnit meget skarpere cellegrænser og tydeligere kernetegning, især tydeligt i nyrevævet, hvor der fandtes ret udtalt opflosning af de luminale begrænsninger, stærkest udtalt i tubuli contorti.

Det er i denne sammenhæng meget interessant, at der ved behandling med så godt som alle syrerne (med undtagelse af salpetersyre, floroglucinsalpetersyre og kromsyre) ses bedre farvning ved anvendelse af intravital fixation i forhold til de ikke-syrebehandlede kontrolpræparater. Efter nogle forsøg på afkromering af præparaterne a. m. *Tsiminaki* inden farvningen lykkedes det at få samme forbedring af farvningen som efter syrebehandlingen. (*Tsiminakis metode:* Snittene anbringes i 1/3% kaliumpermanganat i 5 min. — skylles i dest. vand — anbringes i en blanding af lige dele 1% oxalsyre + 1% natriumsulfitopløsning i 10–15 min. Hele proceduren gentages een gang).

Forklaringen på ovennævnte må herefter søges i mindre god forligelighed mellem Kaformacet og hæmatoxylin, således at netop de bedst fixerede præparater (de intravitalt fixerede) ikke lader sig farve så godt som de mindre godt (postmortelt) fixerede præparater. Syrernes indflydelse består da i en afkromering af de kromfixerede væv.

I labyrinthhistologien har dette forhold mindre interesse, idet man sædvanligvis er nødt til at afkalke vævene.

I modelforsøg VII, hvor formålet var at konstatere hvilken fixationsvædske (Kaformacet, Kaformisal, sublimat-alkohol, Susa, Carnoy eller formalin), der var den bedste til intravital fixation, bristede aorta ascendens under forsøg på at gennemskylningsfixere med 10% formol. Der blev foretaget omgående decapitation med opklipning af bullae tympanicae og fixeret i 10% formalin. Ligeledes nyre, lever og rygmarv blev fixerede i 10% formol. Farvning med Haidenhain-Regauds hæmatoxylin af disse postmortelt formolfixerede præparater viste meget dårligt bevarede væv, særligt udtalt for nyre og lever. Rygmarven var mærkeligt nok noget bedre bevaret. Det samme gør sig gældende ved gallocyaninfarvningen og ved farvning med Carazzis hæmatoxylin. Ved sidstnævnte farvning bemærkedes en stærk farvning af alle tre vævsarter, idet udtalt medfarvning af protoplasmaet dog bevirkede udflyden af de i forvejen ikke særligt skarpt konturerede kerner og celler.

Den postmortelle fixation giver således i forhold til den intravitale fixation vævsforandringer, der antagelig er autolytiske. I særlig grad ses dette i nyrevæv, der er næsten lige så følsomt overfor postmortelle forandringer som vævene i det indre øre. Der er på dette punkt fundet fuld overensstemmelse med *Yoshiis* undersøgelser.

Farvningen af de postmortelt formol-fixerede præparater er stærkere, men samtidigt mere udflydende end i de øvrige. I de postmortelt kaformacet-fixerede kontrolpræparater er farvningen ligeledes stærkest i forhold til de vitalt fixerede præparater. Dette beror på en mindre god fixation (respektive mindre udtalt kromering).

2. *Intravital fixation.*

I de øvrige forsøg anvendtes intravital fixation. De anvendte fixationsvædsker var varierende, idet der i modelforsøg II-III anvendtes kaformacetfixering på 3 marsvin. I modelforsøg no. IV anvendtes kaformacetfixation på 1 marsvin og susafixation på 2 marsvin. I modelforsøg no. V anvendtes den almindeligste form for *Carnoys* vædske (iseddike, 1 del; kloroform, 2 dele og absolut alkohol, 3 dele) på 2 marsvin. I forsøg no. VI anvendtes *Carnoy I* (iseddike, 1 del og absolut alkohol, 3 dele) på 1 marsvin og *Carnoy II* (1 del iseddike, 3 dele kloroform og 6 dele absolut alkohol) på 2 marsvin. I forsøg VII, hvor der fixeredes med Kaformacet, Susa, sublimatalkohol, Carnoy, formol og Kromisal (sidstnævnte bestående af 1 del iseddike, 7 dele 5% kaliumdikromat og 12 dele absolut alkohol samt 1 del dest. vand) anvendtes 10 marsvin.

Resultatet af disse forsøg kombineres med vurdering af fixationen af de udtagne nyrevævskontroller fra fixationsgennemskylningen 12. 11. 47 (labyrinthafkalkningsforsøg no. II).

Formålet med disse forsøg var at finde den bedst egnede fixationsvædske til intravital fixation, under hensyntagen til morfologi og til farvbarhed, og om muligt at fremstille en enhedsfixation, der tillod flest mulige specialfarvninger.

Endelig var det også formålet at undersøge, hvilken afkalkningsvædske, der bedst beskyttede vævene mod syrernes hæmmende indflydelse på en senere farvning.

De anvendte væv var: Nyre- og levervæv samt rygmarv, som fjernedes fra de intravitalt fixerede dyr umiddelbart efter fjernelsen af labyrinther. Disse væv blev sammen med hovederne efterfixeret 1 døgn i den ved den intravitale fixation anvendte fixationsvædske. Derpå blev vævsstykkerne skåret i små skiver, og anvendtes efter forudgående hærdning i 70% alkohol til undersøgelse af afkalkningens indflydelse på vævenes farvbarhed. Nogle få stykker anvendtes som kontrol. Sidstnævnte stykker blev skyllet, afvandet, indlejret i paraffin, skåret, monteret og farvet med: *Carazzis* hæmatoxylin, *Haidenhain-Regauds* hæmatoxylin og *Einarsons* gallocyaninkromalunlak.

Forsøgene II, III, IV og V er modelforsøg, hvor det var hensigten at undersøge farvbarhed i forhold til afkalkning med forskellige syrer, men hvor der desuden ved hjælp af kontrolpræparater var lejlighed til at bedømme forholdet fixation-farvning. Forsøgene VI og VII er rene fixationsforsøg. Forsøg VI er væsentligst anstillet med henblik på god Nissl-substansfixation, og forsøg VII er anstillet for om muligt at fremstille en enhedsfixation, hvor der i ikke ringe grad toges hensyn til Nissl-substansens fixation og farvning.

Af praktiske grunde er vurderingen af fixationen ved hjælp af farveintensitet af kerner og Nissl-substans og til dels ved hjælp af de cellulære elementers morfologi delt i en sammenlignende undersøgelse af kontrolpræparaterne hørende til modelforsøg II, III, IV og V samt undersøgelse af tilsvarende præparater fra fixationsforsøg VI. Præparaterne af hjerne, lever og rygmarv fra fixationsforsøg VII beskrives for sig tillige med resultaterne ved mikroskopi af nyrevævskontrollerne fra før omtalte fixationsgennemskylning (12. nov. 47).

Undersøgelserne er foretaget ved hjælp af binokulært sammenligningsmikroskop. Undersøgelserne er foretaget ved dagslys, idet det viste sig, at det diffuse

dagslys var lettere at arbejde med end elektrisk lys, når det gjaldt om at få lige stærkt lys i de halvmåneformede synsfelter.

a) *Sammenlignende undersøgelser af kontrolpræparaterne fra modelforsøg II-III (Kaformacet), IV (Susa), V (Carnoys vædske)* og præparaterne fra fixationsforsøg VI (Carnoy I og II).

Farvning med gallocyanin.

α) *Levervæv:*

De intravitalfixerede præparater viser langt den bedste kernefarvning efter fixation med Carnoy II, 1 time (i dette forsøg er anvendt efterfixation i 1 time og 1 døgn), bedre end efter Carnoy-Lebrun (modelforsøg V) og endnu bedre end efter fixation i Kaformacet og Susa.

β) *Nyrevæv:*

Viser samme forhold, blot er det Carnoy-Lebrun-fixerede præparat bedre end præparaterne fixerede i de øvrige Carnoy-modifikationer.

γ) *Rygmarv:*

Præparaterne fra modelforsøg IV, hvor der foruden Susa er fixeret med Kaformacet, viser praktisk talt samme farvbarhed af glia-cellerne — måske en ubetydelighed bedre i kaformacetpræparaterne. I kontrol V er kernerne i gliacellerne mørkere, men samtidigt er der mere medfarvning af omgivelserne, således at hele billedet trods den kraftigere farveintensitet bliver mere udflydende.

Nissl-farvningen er næsten lige god i kaformacet- og susa-præparaterne, men kommer ikke på højde med Carnoy, 1 time (tildels Carnoy II, 1 time). Det Carnoy-Lebrun-fixerede kontrolpræparat viser derimod stærk medfarvning af det omgivende væv, og der ses næsten ikke Nissl-substans. Der kan nok ses mørkere substans i kernernes omfang, men der er overhovedet ikke tale om formelementer. Hertil kommer yderligere udtalt skrumpning af vævene i de Carnoy-Lebrun-fixerede præparater, også synlig i de andre modifikationer af Carnoys vædske.

Konklusion

Kernefarvningerne er fundet bedst efter fixation med Carnoy-modifikationerne. Disse præparater viste dog samtidig udtalt skrumpning. Nissl-farvningen er bedst i de susa- og kaformacetfixerede præparater, hvor der ydermere ikke er påvist skrumpning af betydning.

Farvning med Carazzis hæmatoxylin.

α) *Nyrevæv:*

Kernefarvning af kontrol II og Kaformacet (IV) er stærkt afbleget i forhold til det susa-fixerede præparat. Der er meget stor forskel på farvningen af Susa IV og kontrol V, idet præparaterne II og IV viser meget dårligere farvning end de Carnoy-fixerede præparater. I sidstnævnte præparater ses imidlertid ret udtalt medfarvning af protoplasmaet, skæmmende helhedsindtrykket.

β) *Levervæv:*

Kontrol II er tilsyneladende smukt fixeret (i morfologisk henseende), men farv-

ningen lader en del tilbage at ønske. Der er ingen tvivl om, at susa-præparaterne i farvemæssig henseende er kaformacet-præparatet langt overlegne. Der ses ikke skrumpninger i nogen af præparaterne. I forhold til susa-præparatet er kontrol V meget distinkt farvet, næsten overfarvet. Carnoy I, 1 døgn præsenterer sig som et meget smukt præparat, hvor kernerne står meget skarpt tegnet, bedre end i susa-præparatet og med meget mere tydelige cellegrænser. Kernetegningen i susa-præparaterne er i forhold til Carnoy I noget ulden. Kromatinsværtningen er næsten den samme i de to præparater.

γ) *Rygmarv:*

Kontrol IV (Kaformacet) er ikke noget godt præparat, men indeholder dog Nisslgranula, der er svagt farvede. I Susa-præparaterne ses kun nukleolus nogenlunde velafgrænset, idet Nissl-substansen viser en udtalt tendens til at confluere. Gliacellekernernes tegning er nærmest identisk i de to præparater.

I Carnoy I, 1 døgn, ses en meget smuk gliakernefarvning, men heller ikke her er Nissl-farvningen tilfredsstillende. Det samme gælder *Carnoy-Lebrun* præparaterne, hvor gliacellekernerne overhovedet er tydeligst, nukleoli er meget skarpt tegnede, medens Nissl-substansen er totalt sammenflydende, omend stærkt farvet.

Konklusion.

Som i foregående farveforsøg er der fundet bedst kernefarvning i *Carnoy*-præparaterne. Samtidig lægger man mærke til den påfaldende forskel i kernefarvning af susa- og kaformacetfixerede præparater, således at de kaformacetfixerede præparater er næsten ufarvede, til trods for en iøvrigt god fixation i morfologisk henseende. Nissl-substansen er i ingen af forsøgene særligt god. Dog er kaformacetpræparatet bedst, selv om farvningen ikke er så god som ønskelig. Den væsentligste indvending overfor de øvrige fixationsmidler er, at Nissl-substansen fremstilles stærkt confluerende.

Farvning med Haidenhain-Regaud:

α) *Levervæv:*

Disse præparater er ikke uden videre kommensurable på grund af den vanskelige differentation (Påpeget i *Okkels'* disputatsarbejde, pag. 72).

Dog ses tydeligt, at cellegrænserne i kontrol II og IV er udflydende, medens kernetegningen er ret pæn. Efter fixation med *Carnoy-Lebrun* og andre Carnoy-modifikationer ses meget skarp og klar kernetegning og cellegrænserne er særdeles tydelige. Samtidigt er kernerne og cellerne noget formindskede.

β) *Nyrevæv:*

Kontrol II er et nydeligt præparat med tydelig kromatintegning i kernerne. Det samme findes i kontrol (Kaformacet) IV, som ellers ikke er et særligt pænt præparat. Børstesømmen er ikke tydelig og mitochondrierne ikke særligt stærkt sværtede. Det susafixerede præparat er pænest.

Carnoy-Lebrun viser overfarvning med blæksorte kerner og med mitochondrier, dannende sammenhængende, sorte flager. Af de øvrige *Carnoy*-modifikationer er II skæmmet af udsvedning i nyrekanalerne, visende sig som tætstillede, ret store, rundagtige dannelser (protoplasmadråber?) liggende luminalt. Carnoy I-præpa-

rat er pænt, men uden større kontrast, således at præparatet ikke kan måle sig med kaformacet- eller susa-præparaterne.

γ) *Rygmarv:*

Viser forhold som anført under Carazzi-farvningen.

Konklusion.

Fixation med *Carnoy*-vædskerne viser en kraftig kernefarvning, særlig udtalt i *Carnoy-Lebrun*-fixerede præparater, hvor kerner samt mitochondrier er af en intens sort farve. Disse vædsker giver dog anledning til skrumpning samt udsvedning af protoplasmaet (?). Også på Nissl-farvningens område virker disse vædsker mindre heldigt, hvorfor Susa- og Kaformacetfixation må være de foretrukne metoder. Susapræparaterne ses noget bedre end de tilsvarende kaformacetfixerede præparater.

b) *Sammenlignende undersøgelse af præparaterne fra fixationsforsøg VI.*

Farvning med Haidenhain-Regaud:

α) *Levervæv:*

De samme vanskeligheder ved differentieringen som omtalt under foregående forsøg gør sig gældende. Præparat fixeret i Carnoy I, 1 døgn var næsten ikke til at differentiere, og var derfor meget mørkt. Protoplasmaet er mørkt uden vakuoler og med udtalte intercellulargrænser. Kernerne er kraftigt farvede, men man kan skelne mellem mere og mindre kromatinholdige former. Præparater fixeret i Carnoy I, 1 time, var lettere at differentiere, men til gengæld mere udviskede, med en svag grålig protoplasmafarvning og svagt farvede kerner. Carnoy II, 1 time og 1 døgn, gav præparater med vakuoledannelse i cellerne, men iøvrigt med skarpe cellegrænser. Kernerne er skarpt tegnede, men protoplasmaet er noget medfarvet, især i 1 døgns-præparaterne.

β) *Nyrevæv:*

Differentieringen noget uensartet i forskellige afsnit, men der er ingen væsensforskelle på Carnoy, 1 time og 1 døgns-præparater. Præparaterne skæmmes af udsvedning i tubuli contorti. Carnoy II, 1 time-præparaterne er langt ringere end de præparater, der har været efterfixeret i 1 døgn, idet der i førstnævnte præparat ses opflosning af cellegrænserne. 1 døgn-præparatet er næsten eksemplarisk, omend med den samme udsvedning som ovenfor omtalt.

γ) *Rygmarv:*

Carnoy I, 1 time præparat er ikke godt, idet billedet er noget udvisket. Kernerne er kun nogenlunde tegnede, bedst i ependymcellerne. Gliacellerne viser noget tilsvarende. Gangliecellerne er kun nogenlunde tegnede. Der er ikke tydeligt specificeret Nissl-substans. Carnoy 1 døgn-præparat er meget smukt med overordentlig nydelig tegning af kerner i ependymceller, gliaceller og gangliceller. Især Nissl-substansen er smuk. Carnoy II, 1 time-præparatet er ikke væsentligt bedre end det tilsvarende Carnoy I-præparat, men der er dog en bedre antydet Nissl-substans. Carnoy II, 1 døgn viser uensartet differentiering. Kerner i ependymceller, gliaceller og gangliceller står skarpt, og Nissl-substansen står meget skarpt.

Konklusion:

Carnoy II, 1 døgn, er som helhed den bedste fixationsvædske, med undtagelse af forholdet til Nissl-substansen, hvor Carnoy I, 1 døgn, synes noget bedre. Begge præparater lider dog under, at cellerne i tubuli contorti sveder.

Farvning med Carazzis hæmatoxylin:

α) *Levervæv:*

Carnoy I, 1 time- og 1 døgnspræparatet viser ingen større forskelle, udover at kernerne er en ubetydelighed bedre tegnede i sidstnævnte. Carnoy II, 1 time- og 1 døgnspræparatet, er næsten lige gode, men ikke meget bedre end Carnoy I, 1 døgnspræparaterne.

β) *Nyrevæv:*

Carnoy II, 1 time- og 1 døgnspræparatet viser den tidligere nævnte afsnøring af celleprotoplasmaet (?), medens Carnoy I, 1 time- og 1 døgnspræparatet ikke har denne skavank. Kernetegningen er lidt bedre i 1 døgns-præparatet (Carnoy I). Tegningen i de bedste præparater i denne gruppe er ikke så skarp og udtalt som i *Carnoy-Lebrun*. Også i denne fixationsgruppe ses udsvedning af protoplasma i tubuli contorti.

γ) *Rygmarv:*

Kernetegningen i gliaceller, ependymceller og ganglieceller er næsten ens i alle grupper. Nissl-substansen er bedst i de to 1 døgnspræparater, uden at der er nogen sikker forskel.

Konklusion:

Carnoy I, 1 døgn er gennemgående det bedste fixativ.

Farvning med Einarsons gallocyaninkromalunlak:

α) *Levervæv:*

Hvad angår kernetegningen og celleafgrænsningen er Carnoy II, 1 timepræparatet ikke så lidt bedre end Carnoy, 1 døgnspræparatet, hvor tegningen er mere udflydende. I forhold hertil viser Carnoy II-præparatet det samme forhold mellem præparaterne med den lange og korte efterfixationstid.

β) *Nyrevæv:*

Her er forskellen ikke iøjnespringende, men der er dog næppe tvivl om, at Carnoy II, 1 timepræparatet er at foretrække, både hvad angår farveintensitet af kromatinet og billedskarphed.

γ) *Rygmarv:*

Her er forholdene mere problematiske. Dog viser Carnoy II, 1 timepræparatet tydelige fortrin fremfor præparat, der er efterfixeret i 1 døgn, idet sidstnævnte er mere udflydende i sin tegning, specielt af Nissl-substansen. I Carnoy I-præparaterne kan der enkelte steder ses udtalt Nissl-farvning, men samtidig er der nogen afblegning af nukleoli og gliacellekernerne.

Konklusion:

Efter denne farvemetode kunne det synes, som om man står sig ved at fixere intravitalt med Carnoy II og efterfixere i 1 time. Der er her i første række taget hensyn til Nissl-farvningen — og tegningen. Når man ved, at der i Carnoy-Lebrun er ca. 33% iseddike, i Carnoy I ca. 25% iseddike og i Carnoy II ca. 10% iseddike (i Kaformacet er der kun 2,5%) kunne dette tyde på, at de store koncentrationer af iseddike influerer uheldigt på Nissl-farvningen. I samme retning må det tyde, at Nissl-substansen ikke er så godt bevaret i 1 døgns-præparatet som i 1 times-præparatet, samt at Nissl-substansen næsten ikke findes i Carnoy-Lebrun-præparaterne.

Da hidtidige resultater ikke i højere grad havde begunstiget håbet om en enhedsfixation, hvor både kerner, celler og Nissl-substans bevaredes i morfologisk og farveteknisk henseende, forsøgtes med en kombination af Carnoys vædske og Kaformacet. Resultatet blev i første omgang Kromisal (iseddike-kaliumbikromat og alkohol), der anvendtes i fixationsforsøg no. VII tillige med Kaformacet, Susa, sublimatalkohol, Carnoy II og formol 10%. Præparaterne undersøgtes i sammenligningsmikroskop efter farvning med *Haidenhain-Regauds* og *Carazzis* hæmatoxyliner og med *Einarsons* gallocyanin.

c) *Sammenligning af præparaterne fra fixationsforsøg VII:*
Farvning med gallocyanin

α) *Rygmarv:*

Carnoy- og formol-præparaterne er ensartede, idet gliacellekerner er pænt tegnede og af ret kraftig farveintensitet, medens Nissl-substansen enten slet ikke ses eller højest er ganske svagt tegnet. Ependymcellerne er særdeles pæne. Nukleolus er ret pæn i formol-præparatet, svag i Carnoypræparatet. I det hele gælder i særdeleshed om Carnoypræparaterne, at boniteten af kernefarvningen er omvendt proportional med Nissl-substansens farvning. Susa og sublimat-alkohol-præparaterne er ret ensartede med pæne Nissl- og gliacallekerne- samt ependymcellekernebilleder. De bedste præparater er kaformacet- og kromisal præparaterne, hvor Nissl-substansen er god. Gliacellekernerne er en anelse bedre i kromisal-præparatet. Til gengæld er der en umiskendelig nedsættelse af kernestørrelsen i kromisalpræparaterne.

β) *Lever:*

Efter fixation med formol ses cellegrænserne utydelige, kernerne er for lyse centralt, idet farvningen er mest intens langs kernemembranerne (præp. var postmortelt fixeret).

Om Carnoy-præparatet gælder noget lignende.

Kaformacet-præparatet er noget dårligere farvet end det foregående, især er kernefarvningen svagere. Som helhed er præparatet ikke så lidt bedre end formol-præparatet. Susa-præparatet afviger ikke meget fra kaformacet-præparatet.

Kromisal-præparatet er meget bedre end Carnoy-præparatet i henseende til skarphed, farvbarhed og cellegrænser. Kernestørrelsen er næsten den samme i de to præparater, med andre ord noget skrumpet i forhold til susa- og kaformacet-præparaterne.

γ) *Nyre:*

Formalinpræparaterne viser ret mørke kerner med nogen skrumpning. Cellegrænserne er flere steder opflossede, især i tubuli contorti. Ductuli efferentes er meget gabende og luminalt begrænsede af rødlige membraner (?).

Carnoypræparatet viser et ret stærkt farvet kernebillede med nogen skrumpning af kernerne.

Susa-, Kaformacet- og Kromisalpræparaterne er nogenlunde ens, bedre i nævnte rækkefølge. Kromisal-præparaterne er mere harmonisk farvet end de øvrige præparater.

Sublimatalkohol-præparatet er noget stærkere farvet end de foregående præparater, men samtidig ses de luminale cellegrænser i tubuli stærkt flossede.

Konklusion:

Efter denne farvning er de bedste fixationsmetoder: Susa, Kaformacet og Kromisal, idet Kromisal dog ligesom Carnoy bringer kernerne (og cellerne) til at skrumpe. Kaformacet og Susa giver gode Nissl-fixationer. Kaformacet giver de bedste kernefarvninger.

Farvning med Carazzis hæmatoxylin:

α) *Lever:*

Formol-præparaterne viser meget mørke, uskarpt tegnede kerner og udtalt medfarvning af protoplasmaet. Cellegrænserne er utydelige.

Iøvrigt er rækkefølgen (de første bedst): Kromisal, Carnoy, Susa, Kaformacet. Sublimatalkohol-præparatet er ganske vist pænt farvet, men alle kerner er opklarede i midten, og der er talrige vakuoler i cytoplasmaet.

β) *Nyre:*

Formol-præparatet er stærkt farvet med dårligt bevarede celler.

Sublimatalkohol og Susa giver de kraftigst farvede præparater. Iøvrigt er der ingen større morfologisk eller tinktoriel forskel på disse i forhold til Kromisal, Carnoy og Kaformacet.

γ) *Rygmarv:*

De dårligste præparater er de Carnoy-fixerede, hvor der totalt mangler Nissl-substans. De øvrige præparater er nydelige og næsten ens. En anelse bedre er Kromisal-, Kaformacet- og Susa-præparaterne i nævnte rækkefølge.

Konklusion:

Som i foregående række bliver resultatet, at fixationsvædskerne Kromisal, Kaformacet og Susa er de bedste.

Farvning med Haidenhain-Regauds hæmatoxylin:

α) *Lever:*

(De enkelte vævsgrupper er i denne farvning forbavsende ensartet differentierede): Carnoy-fixationen giver meget skarpt tegnede kerner med tendens til centrale opklaringer. Protoplasmaet er svagt gråligt farvet, enkelte steder mere blåsort. Cellegrænserne er ret tydelige.

Susa-præparatets kerner syner væsentlig større end i det foregående præparat. Farvetonen er svagere, men af et mere tiltalende udseende, idet den finere kromatintegning kommer overordentligt tydeligt frem. Kernemembranen er meget skarpt tegnet, protoplasmaet er lyst gråt og cellegrænser er lette at se omend mere udflydende i forhold til foregående.

Kaformacetpræparatet er i henseende til kernetegning og cellegrænser identisk med susa-præparatet. Sidstnævnte har dog en sortere tone af protoplasmaet, hvor kaformacetpræparatet er næsten ufarvet. Kernerne er af samme størrelsesorden.

Kromisal-præparatet viser en kernestørrelse, der er noget mindre end ved de to sidste fixationsvædsker. Kernemembraner står tydeligt, og cellegrænser står ligesom i Carnoy-præparaterne meget skarpt. Kernestørrelsen er den samme som i Carnoy-præparatet, men uden sidstnævntes tendens til centrale opklaringer. Protoplasmaet er i forhold til Carnoy-præparatet noget mørkere.

β) *Nyre:*

Carnoy: Kernerne er ret mørke, skarpttegnede med forskelligt kromatinindhold. Cellegrænserne kan anes. Mitochondrier er meget smukke. Flere steder ses basale inklusioner.

Susa: Præparatet ser ud til at være for stærkt differentieret. Alligevel fremtræder kernerne meget smukke, skarpe med nydelig kromatintegning. Der ses basale dannelser, som man dog mere har indtryk af drejer sig om en samlet basalmembran end egentlige basale inklusioner.

Kaformacet: Dette præparat viser kerner, der næsten ligner foregående, men protoplasmaet er noget mere gråligt og cellegrænser er ikke så skarpe. Præparatet fremtræder ikke så smukt som susa-præparatet.

Kromisal: Præparatet fremtræder noget uheldigt, men der er en god kernefarvning. Protoplasmaet er meget mørkt og noget udflydende.

Formolpræparaterne er yderst slette (gælder især lever og nyre, i mindre grad rygmarven).

Sublimatalkohol-præparaterne er heller ikke særligt gode.

γ) *Rygmarv:*

Carnoy: Smukt med skarpt tegnede gliaceller og ganglieceller med tydelige kerner og kerneplet. Kernen er ret lys. Nissl-granula ses, men er ikke tydeligt differentierede.

Susa: Gliacellekerner og kerner i ependymcellerne står overordentligt smukt på baggrund af det ret lyse gliavæv. Præparatet ligner i tonerne det foregående præparat, men hævder sig ved at vise meget tydelige Nissl-granula på helt lys baggrund.

Kaformacet: Er alt for hårdt differentieret, men til trods herfor kan man se multipolare, motoriske forhornsceller med Nissl-granulategning susapræparatet.

Kromisal: Præparaterne er ret mørke. Kerner i ependymceller og gliaceller står pænt, ligeledes kerner i gangliecellerne. Nissl-granula er af varierende tydelighed og fremtræder i flere tilfælde som store brokker.

Konklusion:

Det er fremdeles Carnoy-vædskerne og det hermed beslægtede Kromisal, der giver de mest intense kernetegninger. De mest harmoniske præparater fremstilles

imidlertid ved fixation med Kaformacet og Susa, hvis største fortrin er at give gode Nissl-billeder.

De hidtil beskrevne fixationsundersøgelser kan kompletteres af vævsundersøgelser i tilslutning til gennemskylningsfixationerne 12. 11. 47. Formålet med dette forsøg var at fremskaffe et forskelligt fixeret, men iøvrigt ensartet materiale af marsvinehoveder, og samtidig en prøve på forskellige fixationsvædskers anvendelighed overfor vævene i det indre øre (kontrolleret ved hjælp af nyrevæv). Der blev farvet med Bøhmers hæmatoxylin, Weigerts hæmatoxylin og gallocyanin.

Farvning med gallocyanin:

Med denne farvning findes kernefarvningen i tubuli contorti og i glomeruli mest intens i de sublimat-alkoholfixerede præparater (1 og 2). Dernæst kommer de formol-fixerede og derefter de Carnoy-fixerede præparater. Præparater fixerede med Kaformacet og Kaformisal (samme sammensætning som Kromisal, blot er de 50 cc dest. vand erstattet med 50 cc. 40% formol, i håbet om at denne formoltilsætning kunne hindre alkoholens skrumpende indflydelse) er forholdsvis svagt tegnede. Susa-præparater indtager en mellemstilling mellem de formolfixerede og kaliumbikromat-fixerede præparater.

Farvning med Bøhmers hæmatoxylin:

Kaformisalpræparatet sammenlignet med kaformacetpræparatet viser glomeruli ensartede af størrelse med ensartede kerner. Kernerne i tubuli contorti og samlerør er lidt svagere i kaformacet-præparatet. Samtidig med den stærkere tegning af kernerne i tubuli contorti i kaformisal-præparatet findes en større protoplasmatisk medfarvning. Ved sammenligning mellem susa-præparatet og de to foregående findes en protoplasmatisk medfarvning som i kaformacetgruppen, men kernefarvningen er mere distinkt. Glomeruli er af samme størrelsesorden og kapselrum af tilnærmelsesvis samme størrelse. Cellekonturerne står lige godt i susa- og kaformacetpræparaterne, er lidt udviskede i kaformisalpræparatet.

I formol-præparatet er protoplasmafarvningen næsten som i kaformisalpræparatet, men kernetegningen er betydeligt bedre og mere distinkt. Imidlertid er der betydelig skrumpning af samtlige vævselementer med små glomeruli og middelstore kapselrum.

Desuden er der udtalt opblødning og udviskning af de luminale konturer i tubuli contorti med tab af børstesøm flere steder.

Carnoy-præparaterne forholder sig på samme måde, udover at der er ringe protoplasmatisk medfarvning.

Sublimat-alkoholfixerede præparater viser ringe medfarvning af protoplasmaet og ret distinkt kernefarvning, omend ikke så kraftig som formol- og Carnoy-præparaterne. Der ses den samme udflyden af de luminale konturer i tubuli contorti, og glomeruli er meget skrumpede med forstørrede kapselrum.

Farvning med Weigerts hæmatoxylin:

Der ses kun små afvigelser i den protoplasmatiske medfarvning. Kernefarvningen er mindst distinkt i rækkefølgen: Kaformacet, Kaformisal, Susa. Kernefarvningerne er mere distinkte i Carnoy-sublimatalkohol- og formol-præparaterne, men til gengæld findes tegn på dårlig fixation med udflyden af cellegrænserne

ind mod lumen i tubuli contorti, opflossen af cellerne og tab af børstesømmen. Der ses skrumpning af glomeruli med forstørrelse af kapselrum, mest udtalt for sublimatalkohol-præparaterne.

Konklusion (Omfattende samtlige intravitale fixationsforsøg):

Det må pointeres, at fixationen ved intravital gennemskylning er væsentligt bedre i morfologisk og farveteknisk henseende end den postmortale fixation. Forsøg på at fremstille en fixationsvædske, der tillader mange specialfarvninger, er mislykkedes. I alle tilfælde er det ikke lykkedes at fremstille en fixationsvædske, som på samme tid kan fremstille kerner og Nissl-substans ideelle. Dette stemmer med de erfaringer, der findes i *Peter Grays* arbejde: »Notes on the Pratice of Fixation for Animal Tissues«.

De intravitale fixationsforsøg viser eentydigt, at fixationen bliver meget bedre i de susa-fixerede præparater og i de præparater, der er fixerede i kaliumbikromatholdige vædsker. I de formol,-sublimatalkohol- og Carnoy-fixerede præparater ses skrumpning af celler og kerner, udsvedning eller opflosning af de luminale begrænsninger i tubuli contorti med tab af børstesømmen. Desuden ses skrumpning af glomeruli med udvidelse af kapselrum. Kernefarvningerne (med gallocyanin og især med forskellige hæmatoxyliner) er bedre i præparater fra tre sidstnævnte grupper i forhold til præparater fixerede i susa eller kaliumbikromatholdige vædsker. Imidlertid må en god fixation foretrækkes for en tilsyneladende god kernefarvning, da en dårlig fixation ikke kan ændres, hvorimod det i reglen er muligt at få en god kernefarvning frem i et godt fixeret præparat ved overfarvning og passende differentiering.

Det er værd at lægge mærke til, at de Carnoy-fixerede præparater giver meget intense farvninger af kernerne med hæmatoxyliner, mens næsten det omvendte er tilfældet ved gallocyaninfarvning. Men vigtigere endnu er, at alkohol-iseddike-kloroform-blandinger ikke tillader god fixation af Nissl-substansen og lige så lidt god farvning af denne.

Når der derfor skal tages videst muligt hensyn til fixationen af forskellige vævsformer og disses farvning, specielt med *Einarsons* gallocyanin, vil fixation ved hjælp af *Wittmaacks* vædske eller modifikationer af denne tillige med fixation i susavædske være at anbefale ved intravital fixationsgennemskylning.

En ulempe ved kaformacetfixation i forhold til susafixation er den svagere farvning af kernerne med hæmatoxylin. Ulempen er mindre efter fixation med Kaformisal, og forsvinder fuldstændigt, hvis præparatet har været udsat for en ikke for drastisk afkalkning. Forholdet antages at bero på syrernes afkromerende indflydelse, hvorved der skabes bedre kontakt mellem det fixerede væv og hæmotoxylin. Beviset herfor må ses i, at man ved hjælp af *Tsiminakis* afkromering med kaliumpermanganat og oxalsyre + natriumsulfit er i stand til at få overordentligt smukke kernefarvninger på kaformacetfixerede præparater.

Under afsnittet labyrinthfixation er det de samme fixationsvædsker, der giver de bedste resultater. Dette tages til indtægt for, at ovennævnte egenskab ved Kaformacet ingen rolle spiller indenfor labyrinthhistologien.

Fixation med Kaformacet foretrækkes, idet den som pointeret af *S. H. Mygind, H. C. Andersen og J. Arnvig* giver de skarpeste billeder. På den anden side kommer

susafixationen det intravitale billede nærmere end nogen af de øvrige fixationsvædsker, Kaformacet indbefattet.

Werner foretrækker Kaformacet, idet han ved fixationsforsøg på frølabyrinther har fundet denne mest egnet blandt mange andre. Han nævner dog ikke, hvilke andre fixativa det drejer sig om.

Fixation med Kaformacet foretrækkes, fordi den giver forholdsvis hurtig og ensartet fixation med gode histologiske billeder, og fordi den giver bedst fixation og farvning af Nissl-substansen, hvis forhold til afkalkning har dannet udgangspunktet for mine undersøgelser.

C. Afkalkningen

Definitionen på afkalkning er allerede anført som en fjernelse af uorganiske bestanddele i knoglevævet ved hjælp af brintionholdige vædsker, i overvejende grad syrer.

Ved bestemmelse af afkalkningstid for forskellige syrer måtte der skaffes egnet knoglevæv i passende størrelse, inden yderligere undersøgelser kunne påbegyndes.

a) *Afkalkningsobjekter:* De første anvendte knoglestykker var costae fra menneske. Materialet stammede fra Rigshospitalets lungekirurgiske afdeling, hvor der ved thoracoplastik jævnligt fjernedes *ribbensstykker*. Stykkerne blev straks efter udtagelsen anbragt i Kaformacet, fremstillet så frisk som muligt. Efter 1 døgns fixation hærdedes de i alkohol og opbevaredes i 70% alkohol til modelforsøgene.

Inden anvendelsen blev der savet 1 cm lange stykker, der skylledes i rindende vand i 24 timer. Stykkerne blev forsynede med sytråd, ved hjælp af hvilken de kunne hænge opadtil i syreglasset under afkalkningen. Herved fik kalksaltene lettere mulighed for at diffundere.

Disse knoglestykker anvendtes som afkalkningskontrol i de første 5 modelforsøg. Afkalkningstider for nogle af syrerne ses i nedenstående tabel:

Tabel III

Syreart og -styrke	Afkalkningstider (døgn eller timer)			
	I	II	IV	V
HNO_3, 5 %	22 timer	22 timer	17 timer	15 timer
HCl, 5 %	22 –	22 –	17 –	15 –
H_2SO_3, 5 %	41 –	46 –	41 –	26 –
H_2SO_4, 5 %	14 døgn	7 døgn	9 døgn	8 døgn
H_3PO_4, konc.	14 –			
H_2CrO_4, 2 %	9 –			
H_2CrO_4, 5 %		3 døgn		
HCOOH, 10 %		46 timer	30 timer	26 timer
CCl_3COOH, 10 %	63 timer	3 døgn	44 –	39 –
$C_2H_4OHCOOH$, 10 %	5½ døgn	7 –	4 døgn	3 døgn
$C_6H_8O_7$, H_2O, 10 %	6½ –	5 –	4 –	3 –
HNO_3-citrat (Sørensen)			9 –	7 –
HCOOH, konc.	14 –			

Afkalkningstider for 1 cm lange ribbensstykker ved anvendelse af forskellige syreopløsninger af styrke som opgivet i litteraturen.

Man lægger mærke til den nedadgående tendens i afkalkningstiderne fra det første til det sidste forsøg. Dette forhold er sandsynligvis forårsaget af anvendelsen af forskellige ribben i de forskellige forsøg. Nedgangen er nogenlunde ligelig for samtlige syrer, mindst jævn for de langsomt afkalkende organiske syrer. Afkalkningstiden kunne med disse testobjekter aldrig blive helt pålidelige, ydermere da anvendelsen af stikke-skæremetoden som kontrol ikke var tilfredsstillende. Der søgtes derfor andre modelknoglestykker, hvor samme syrebehandling gav samme afkalkningstid, helst i forbindelse med en talmæssig opstilling af afkalkningens forløb.

Det fandtes mest formålstjenligt at arbejde med knoglevæv af samme tæthed som labyrinthkapslen, hvis afkalkning disse undersøgelser tog sigte på.

Ved henvendelse til »Den kongelige Veterinær- og Landbohøjskoles anatomiske Afdeling« fik jeg oplyst, at forpiben fra heste formentlig besad de ønskede egenskaber. Denne knogle indeholdt rigeligt substantia compacta af stor tæthed.

b) *Forsøg over anvendeligheden af substantia compacta fra hesteforpibe som afkalkningsmodel:* Der fremskaffedes fra Landbohøjskolens anatomiske afdeling en del af disse hesteknogler. Et par af samme farve og stor vægtighed fra samme hest blev lagt til side til anvendelse, når de indledende undersøgelser var afsluttede.

Alle hesteknoglerne blev anbragt i høje glas med 4% formalin (vandig), epifyserne blev savet fra, den hvide knoglemarv fjernet og stykkerne atter anbragt i formol.

En enkelt af knoglerne blev hos et drejerfirma savet i ringe af 2 mm tykkelse, men ikke tilstrækkeligt nøjagtigt. Det var oprindeligt hensigten at anvende disse knogleringe som afkalkningsindikatorer med røntgenpladen som hjælp. Det var hensigten at følge og talmæssigt udtrykke den med afkalkningen tiltagende sværtning af røntgenpladen, idet data for røntgenfotograferingen naturligvis blev holdt konstante (kilovolt, milliampere, exponeringstid, afstand, blænde, fremkaldelse og fixering).

Ved første røntgenfoto (22. 10. 46, R. H.) anvendtes 10 af disse ringe. De viste sig at give ret ensartet skygge på pladen (sinofilm 9×12), undtagen på steder, hvor der under savningen var fremkommet en lille kam i kanten af ringen. Et sådant fremspring gav mere intens skygge. Skyggerne var jævne og bortset fra de bageste flader fuldstændig fri for antydning af spongiøs tegning.

Der iværksattes derefter med de samme ringe et nyt forsøg med 5% salpetersyre. 4 af ringene tjente som kontrol. De 6 øvrige afkalkedes på den måde, at een af ringene toges ud af gangen, indtil der ikke var flere tilbage. Samtlige knogleringe skylledes i rindende vand, hvorpå de røntgenfotograferedes (4. 11. 46).

Tabel IV

Afkalkningsforsøg med knogleringe
(Beg. 2. 11. 46 kl. 13)

Nr.	Dato	Kl.	Timer	Knoglekonsistens	Stikken	Skæren
5	2.11	1600	3	hård	÷	÷
6		1900	6	blødere	÷	÷
7		2200	9	bøjelig	+	÷
8	3.11	0100	12	—	+	+
9		0400	15	—	+	+
10		0700	18	—	+	+

Det viste sig herved, at skæremetoden til bestemmelse af fuldstændig afkalkning var bedre end stikke-metoden. Skæremetoden var dog ikke i stand til at afsløre mindre partier, hvor der ved røntgenfotograferingen fremdeles fandtes kalksalte. Det var kun, hvad man kunne vente. Værre var det, at afkalkningen ikke forløb helt ensartet. Dette hang imidlertid sammen med tykkelsesvariationer i ringene, der ikke var blevet savet særligt nøjagtigt.

For at få knogleringene så ensartede som muligt, henvendte jeg mig til Gymnastik-theoretisk Institut, hvor der på drejebænk blev savet nogle ringe til yderligere, indledende forsøg. Knogleringene blev trukket på snor, for at skabe sikkerhed for, at der kun foretoges sammenlignende undersøgelser over knogleringe fra samme knogle.

Disse ringe viste sig, målt med skydelære at være helt anderledes nøjagtige end de oprindeligt fremstillede.

Med disse ringe iværksattes et nyt forsøg. Det påbegyndtes 23. 4. 47, og der anvendtes som afkalkende medium 1 n salpetersyre, idet jeg nu var blevet opmærksom på fordelen ved at arbejde med normale opløsninger. Ved røntgenfotografering viste knogleringene sig at afkalkes ensartet såvel fra fladen som fra randen.

Som yderligere kontrol foretoges 20. 5. 47 et forsøg med samme art knogleringe, der afkalkedes to og to i 1 n myresyre, for at se om knogleringene også fulgtes ad, som de burde. Samtidig begyndtes undersøgelse af afkalkningsvædskens pH under processens forløb.

Tabel V

Forsøg over kontinutiteten ved afkalkning af knogleringe
(Påbeg. 20. 5. 47 kl. 8)

Nr.	Dato	Kl.	Stik	Skæren	pH (beg. pH=1.8)
1	20.5	11	÷	÷	2.0
2— 3		14	÷	÷	
4— 5		17	÷	÷	2.2
6— 7	21.5	08	(+)	÷	2.4
8— 9		12½	+	(+)	
10—11		17	+	+	
12—13	22.5	08	+	+	2.5

Ringene skylles i vand. Foto 23. 5. 47 på R. H.s røntgenafdeling.

Forsøget viste forskellige ting. For det første fulgtes knoglepladerne på smukkeste måde ad to og to, således at man herefter måtte have ret til at anvende dem i afkalkningsforsøg og stole på resultaterne. For det andet bekræftedes, at skæremetoden er bedre end stikkemetoden, samt at røntgenmetoden slet ikke tåler sammenligning med disse meget anvendte metoder til bedømmelse af afkalkning. Endelig viste forsøget, at man ved anvendelse af myresyre får et fald i brintionkoncentrationen. Et sådant fald forekom ikke ved brug af 1 n salpetersyre i forrige forsøg (hvor pH var negativ under hele forsøget).

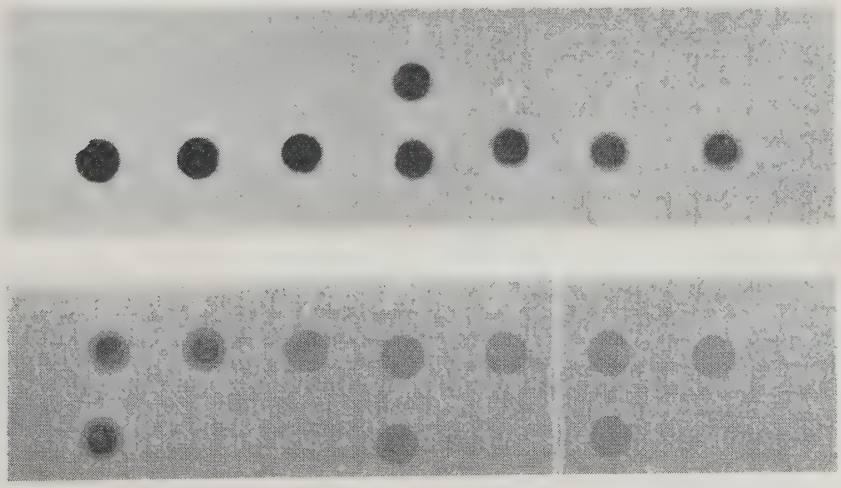
c) Selv om der tilsyneladende var opstillet en pålidelig metode, med hvilken man kunne følge afkalkningen og bestemme dennes afslutning nøjagtigere end ellers var det nødvendigt at gøre metoden endnu mere nøjagtig af hensyn til pH-målingerne i de forsøg, som nu skulle iværksættes. Dette ville igen sige, at det måtte forsøges at fremstille knoglestykker af samme størrelse og helst af samme vægt.

På Gymnastik-theoretisk Institut forsøgtes at stanse circulære knogleplader ud af knogleringe fra en særlig vægtig hesteforpibe. Der blev fremstillet en stanse bestående af en gennemboret stålplade og en lige afskåret stålstang, der passede nøjagtigt til udboringen i pladen. I forbindelse med stålpladen var en opstander, hvorigennem stålstangen forsynet med en tværstang gik med gevind, så man ved et par drejninger på tværstangen kunne føre stålstangen ned gennem pladens udboring. Knogleringene lagdes hen over udboringen, hvorefter den vertikale stang pressedes ned mod knogleringen. Herved pressedes et stykke af samme størrelse som udboringen (7,5 mm) ned gennem denne og opsamledes. Ved at foretage stansningen på forsigtig, men bestemt vis, (i sædeleshed var det vigtigt hele tiden at tørre knoglestøv væk fra udboringens rande, da knogleringene ellers knækkede), lykkedes det at fremstille ca. 500 af disse små knogleplader. De var 2 mm med tykkelsesvariationer på indtil 1/10 mm, diameteren var 7,5 mm, og vejning af disse knogleplader på analysevægt viste en vægt omkring 170 mg med afvigelser på $\pm$ 1–2 mg.

Knoglepladerne underkastedes en endelig prøve den 7. 6. 47 ved hjælp af 1 n salpetersyre. Der anvendtes 1 kontrolplade, der ikke afkalkedes, og 17 knogleplader, der afkalkedes (heraf 4 par). Knoglepladerne (eller parrene af knogleplader) toges ud af afkalkningsvædsken med mellemrum på ½ time. De skylledes i rindende vand i 24 timer og røntgenfotograferedes 9. 6. 47. (R.H., rtg.-afd.).

Figur 1.

Fotokopi af røntgenbillede af modelknogleplader, afkalkede i salpetersyre (9. 6. 47).



Billedet viste en fortrinlig kontinuitet i afkalkningen fra plade til plade, og knoglepladerne i de 4 par fulgtes udmærket ad. Fotografiet illustrerer også tydeligt, at afkalkningen foregår såvel fra fladen som fra randen af knoglepladerne.

Konklusion.

Efter en række indledende forsøg er det lykkedes at fremstille knogleplader 2 mm tykke med en diameter på 7,5 mm, stammende fra substantia compacta fra hesteforpibe. Disse knogleplader viste sig egnede til at følge afkalkningens forløb samt derunder til at bestemme afkalkningens slutpunkt.

Data for røntgenfotograferingen, som fandt sted på Rigshospitalets røntgenafdeling var følgende: 150 kilovolt, 45 milliampere, 0,35 sek., afstand 100 cm, fremkaldelse 7 minutter, fixering 10 min. Der blev anvendt røntgenrør med skærm for at give skarpere billeder. Den anvendte film var Gevaert sinofilm (format 9×12 cm) af samme sending for at sikre sig film med samme emulsion.

Knoglepladerne blev inden fotograferingen anbragt direkte på det papir, sinofilmen var indpakket i, da papiret alligevel blev kasseret ved udtagningen af den belyste røntgenfilm.

2. Metoder til vurdering af afkalkningen

Når man har med afkalkningsvædsker at gøre, løber man en vis risiko for at kompromittere vævenes farvbarhed ved at lade dem blive længere i vædskerne end nødvendigt. Fænomenet betegnes i almindelighed som overafkalkning, i virkeligheden en dårlig betegnelse, da det i hvert tilfælde ikke kan dreje sig om afkalkning, snarere om en ekstra syrepåvirkning af det resterende organiske væv. I nedenstående lille oversigt ses, hvilke forfattere, der har beskæftiget sig med problemet:

	Overafkalkning
Ikke for længe i syre efter afkalkning	*Busch, Herxheimer* (nedsat farvbarhed), *Jaffe, Støhr* (vævsødelæggelse), *Wilson* (ødelæggelse af kernefarvning), *Richman, Gelfand & Hill* (vævet ødelægges), *Alexander & Fischer* (kvældning), *Hagens* (vævsødelæggelse), *Schaffer*
Ikke for længe ved 37°	*Williams* (maceration), *Plum & Pindborg* (total opløsning af vævet), (Richman & al. burde også nævnes her (30—45°))
Overafkalkning umulig	I Müllers vædske (*Mc. Clung*)
— —	I myresyrecitrat (*Anna Morse*)

Efter ovenstående er det af vigtighed at få bestemt *afkalkningens slutpunkt* nøjagtigt. Den må ikke vare for længe af hensyn til de vævsødelæggende virkninger,

men må på den anden side ikke afbrydes for tidligt, da man så risikerer ikke at kunne skære præparaterne. De eneste vædsker, hvor man kan tage overafkalkning med større sindsro, er Müllers vædske og myresyrecitrat. Af disse er Müllers vædske så langsomt afkalkende, at den ikke vil finde praktisk anvendelse, og myresyrecitratets forhold vil blive omtalt senere.

Metoder til bestemmelse af afkalkningens slutpunkt er omtalt på siderne 41–42 i forbindelse med en oversigt over de anvendte og anvendelige metoder.

I de første modelforsøg (II, III, IV og V) anvendtes stikke- og skæremetoden, men ved forsøgene på at finde et mere egnet knogletestobjekt har hverken skære- eller stikkemetoderne vist sig gode. Ved sammenligning mellem røntgenfund og stikke- og skærefund fandtes eentydigt, at man registrerede afkalkningens slutpunkt alt for tidligt ved hjælp af stikkemetoden. Skæremetoden var bedre, men ikke pålidelig, idet denne metode ikke kunne påvise mindre, centrale kerner af kalksalte.

Ved mine tidligere undersøgelser over marsvinelabyrinther anvendtes den af *Møbius* efter *Wittmaack* refererede prøve for afkalkning med kalilud. Efter resultaterne af røntgenfotografering og af hensyn til det billedmateriale, der kunne illustrere *afkalkningens forløb*, var der ingen tvivl om, at denne undersøgelsesform måtte anvendes. Metoden var ganske vist omtalt af *Alexander & Fischer* og af *Schmorl*, men blev ikke forsøgt til bestemmelse af afkalkning før *Hagens* fremkom med sit arbejde desangående. I sammenhæng med spørgsmålet: Afkalkningens forløb har det en vis interesse, at *Schede* forsøgte at finde en almengyldig formel efter hvilken man skulle være i stand til exakt at måle kalkindholdet i knoglevæv på røntgenbilledet. Det lykkedes ikke, men i stedet fremstillede *Schede* en aluminiumskile, som kunne fotograferes sammen med det objekt, hvis kalkindhold, man ville bestemme. Billedet af kilen blev klippet ud og sammenlignet med knoglen, indtil man fandt samme skyggeintensitet. Idet man på forhånd vidste, hvor meget de forskellige tykkelser af aluminiumskilen svarede til, havde man kalkindholdet. Metoden kunne ikke uden videre anvendes ved mine undersøgelser.

For at skaffe oplysninger om afkalkningens forløb i de senere knogleplademodelforsøg var det nødvendigt at gå en anden vej. I denne anledning iværksattes *røntgenforsøg no. III*, hvortil anvendtes 24 knogleplader, som anbragtes i et højt glas indeholdende 600 cc. 1 n salpetersyre. Knoglepladerne var ophængt ved hjælp af sytråd på to glasstave i en bestemt rækkefølge. Forsøget begyndte kl. 10.00, og derefter udtoges en plade med nøjagtig et kvarters mellemrum til skylning i rindende vand. Forsøget var overstået i løbet af 6 timer. Alle knoglepladerne henstod i rindende vand til næste dag, hvorefter de blev fotograferede på samme sinofilm.

Formålet med denne fremgangsmåde var dobbelt: 1) At fremskaffe en ny vurdering af knoglepladernes anvendelighed til bestemmelse af afkalkningsgraden, 2) at anvende dette fotografi ved bedømmelsen af kalkindholdet i andre optagelser under de øvrige afkalkningsforsøg. Alle 24 knogleplader tillige med een ikke afkalket plade blev underkastet kalkanalyse.

Tabel VI

Analyse af afkalkede knogleplader
(Fra røntgenforsøg III)

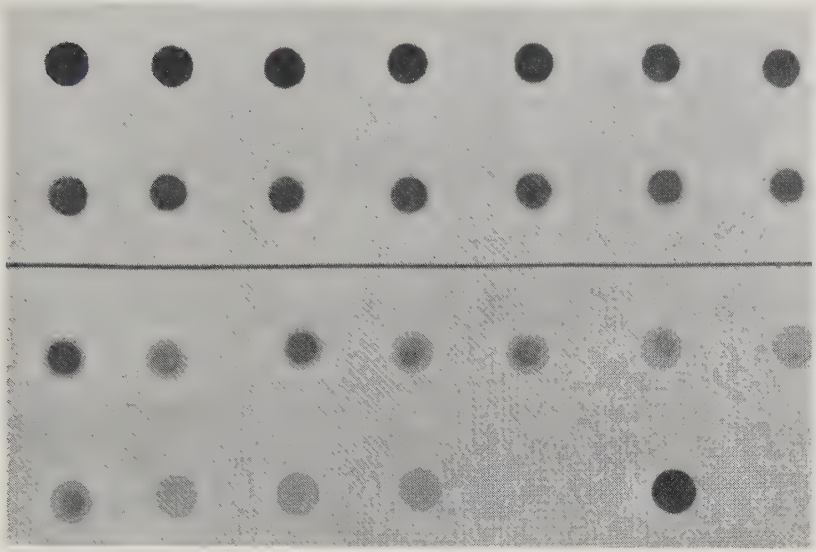
No.	Knoglevægt mg	Ca i knogle mg	Ca i vædske mg %
0	168.1	39.0	3.1
1	132.9	30.2	
2	119.5	24.7	
3	113.2	22.3	
4	107.2	22.45	
5	91.1	17.9	2.9
6	90.8	16.45	
7	82.4	14.05	
8	74.8	11.45	
9	73.2	9.70	
10	72.7	9.96	
11	72.6	9.88	
12	62.5	7.30	
13	65.2	7.24	
14	61.8	6.10	
15	46.0	1.91	3.3
16	55.0	4.24	
17	46.0	1.88	
18	48.9	2.32	
19	44.8	0.970	
20	41.0	0.238	
21	45.2	1.013	
22	40.0	0.113	
23	44.1	0.174	
24	44.4	0.34	2.2

Ved sammenligning mellem disse tal og røntgenbilledet af disse knogleplader (se fotokopi af røntgenbillede næste side) ser man hvor god røntgenmetoden er. Selv i den stærkest afkalkede plade findes endnu smårester synlige på røntgenbilledet, og mindst svarende til knoglepladerne nr. 22 og 23. Dette stemmer på det smukkeste med kalkanalyserne, der er udført på dr. phil. Hoff-Jørgensens foranledning på Biokemisk Institut. Knoglepladerne tørredes ved stuetemperatur på filtrerpapir i 24 timer, hvorefter stykkerne vejedes. Derefter foretoges en foraskning på stykkerne ved 600° C. i elektrisk ovn i platindigler, og indholdet af Ca bestemtes i asken ved en modifikation af *Larsen & Greenbergs metode* (J. Biol. Chem. 123, 199).

Såvel røntgenbillederne som kalkanalyserne viser, at der ikke er helt ideel kontinuitet, især ved de stærkt afkalkede knoglestykker. Hvis man imidlertid kun anvender til og med nr. 14 til registrering af Ca-indholdet gør man ikke større fejl. Man kunne ved stærkt afkalkede plader bestemme Ca-indholdet blot ved at finde en knogleplade med tilsvarende kalkrest i røntgenkontrolfotografiet. Sidstnævnte metode må være tilladelig, når Ca-analyse og sværtningsintensitet på røntgenfilmen viser overensstemmelse.

Oprindelig var det hensigten at foretage disse sammenlignende analyser af knoglepladerøntgenfotos ved hjælp af fotometri, på samme måde som denne metode

Figur 2.
Fotokopi af røntgenbillede af modelknogleplader (12. 9. 47).



blev anvendt til undersøgelse og måling af kernemodelpræparaternes farvningsintensitet. Metoden kunne imidlertid ikke gennemføres på disse røntgenbilleder. De viste sig at være så lystætte, at man kom til at arbejde med meget små lysforskelle i et område, hvor der var meget mørkt (absorption af lyset fra 98% til 100%: næsten helt mørkt til fuldstændigt mørkt). Det hjalp ikke at skrabe filmsemulsionen af på den ene side, ej heller hjalp det at anvende mindre lystætte filtre i fotometret eller at fjerne filteret fuldstændigt.

Selvom fremgangsmåden med fotometri var lykkedes rent teknisk, bød metoden på endnu en vanskelighed: Røntgenfilmene viste til trods for pinlig overholdelse af data for fotograferingen sværtninger af filmen (og hermed også for knoglepladerne), som kunne afvige meget stærkt fra film til film. Dette beroede dels på svingen i belysningsstrømmen, dels på at fremkaldervædsken var af forskellig alder og temperatur. Især i sommermånederne, hvor de fleste forsøg foretoges, var temperaturen så høj, at billederne blev for sorte. Denne varieren af filmenes grundtone ville have været til stor gene ved fotometrisk bedømmelse af knoglepladernes sværtningsintensitet.

Da der på røntgenfilmen foruden aftagende sværtningsintensitet (afkalkning fra fladen) fandtes en koncentrisk afsmalning af knoglepladerne (afkalkning fra randen), var det naturligt at måle denne afsmalning for at se, om den gav et kontinuerligt udtryk for afkalkningen af knoglepladerne. Dette viste sig over forventning at være tilfældet, og problemet var nu at finde en fremgangsmåde til måling af denne afsmalning på samtlige røntgenbilleder. Der forsøgtes mikroskop med meget svag forstørring, med forstørrelsesapparater og med en lup, forsynet med okularmikrometer. Intet var tilfredsstillende. Så forsøgtes med et *Thomas-Houston*

mikrolæseapparat, der forstørrede 7 gange. Først fjernedes frontglaspladen, og der anbragtes på læsepladens plads et stykke hvidt, glittet papir. Derefter anbragtes et okularmikrometer ovenpå kondensoren, således at mikrometerets inddeling i 1/10 mm blev projiceret ned på papiret på læsepladen. Delestregerne blev trukket op med tusch, således at der på papiret fandtes en horizontal og en vertikal skala, begge på 16 delestreger. Okularmikrometeret blev fjernet. Glaspladerne, der skulle holde filmen, blev sat på plads. Røntgenfilmene indsattes, hvor man ellers indsatte mikrofilm. Aflæsningen foregik i et mørkt rum for bedre at kunne se overgangen mellem fuldstændigt og delsvis afkalket knoglevæv. Billederne af de små knogleplader, 7 gange forstørret, førtes hen over den vertikale og horizontale skala, hvorved det var let at bedømme, hvor mange delestreger, randafkalkningen svarede til.

Tabel 7 viser en opstilling af de i røntgenforsøg III fotograferede knogleplader med angivelse af knoglepladevægt og vægt af Ca i knoglepladerne, således at disse vægte for nemheds skyld er rundet af til nærmeste hele tal (undtagen for tallene < 1). Desuden er angivet afsmalning af knoglepladerne, registreret med $\frac{1}{2}$ delestregs nøjagtighed (svarende til 1/20 mm). I de tilfælde, hvor der er intervaller (mellem knogleplade nr. 0–1 og 1–2, samt mellem 7–8, 8–9 og 14–15) er de tilsvarende værdier for knoglepladevægt og vægten af Ca fundet ved interpolation. Disse værdier er indrammede i parentes.

Oprindeligt opstilledes tabellen for efter aflæsning af randafsmalningen at kunne angive afkalkningens forløb ved hjælp af knoglepladernes indhold af kalk. Det var imidlertid meget lettere at angive afkalkningens forløb direkte ved hjælp af afsmalningens størrelse.

Murayama & al. anvendte i deres afkalkningsundersøgelser også bestemmelse af Ca, idet de foretog daglig analyse over Ca-mængden, der var gået over i afkalkningsvædsken (metoden hertil ikke beskrevet). I tabellerne fra dette arbejde ses et større kalkindhold de første dage, derefter faldende for til sidst at være lig 0. Afkalkningen er således i virkeligheden fulgt daglig, uden at forfatterne har draget andre konklusioner heraf, end at vævene er afkalkede, når der ikke længere kan påvises kalk i afkalkningsvædsken. I slutningen af arbejdet omtales, at dette kan afgøres ved at prøve, om der kommer udfældninger ved tilsætning af ammoniumoxalat til den neutraliserede prøve af afkalkningsvædsken!

Bestemmelse af pH under afkalkningen er ikke tidligere foretaget, udover, at *Lillie* i sit arbejde om afkalkningen af knoglevæv (spec. knoglemarv) har foretaget måling af afkalkningsvædskernes pH ved begyndelsen af afkalkningen under henvisning til, at det ved kontrol af den initiale pH skulle være muligt at kontrollere beskadigelsen af knoglemarvsfarvningen. Dette resulterede i forsøg med anvendelse af en række stødpudeopløsninger med varierende begyndelses-pH.

Som indledende pH-undersøgelser er der i dette arbejde foretaget undersøgelser over pH's forhold ved fuldstændig trætning af syrer samt undersøgelser over pH's forhold ved anvendelse af syremængder, der støkiometrisk svarer til knoglepladernes kalkindhold. Endvidere er der foretaget kontinuerlig pH-undersøgelse i samtlige forsøgsrækker over afkalkningen. Hensigten hermed var at få oplysninger om syrernes styrke (resp. deres evne til at holde brintionkoncentrationen

Tabel VII

Knoglepladeafkalkning med 1 n HNO_3 sammenholdt med kalkanalyser og randafsmalning på røntgen-foto. (Røntgenforsøg III: 12. 9. 47)

Nr.	Afsmalning (1/10 mm)	Knoglepladevægt (mg)	Vægt af Ca (mg)
0	0	168	39
	(½)	(150.5)	(34.5)
1	1	133	30
	(1½)	(126.5)	(27.5)
2	2	120	25
3	2½	113	22
4	3	107	22
5	3½	91	18
6	4	91	16
7	4½	82	14
	(5)	(78.5)	(12.5)
8	5½	75	11
	(6)	(74)	(10.5)
9	6½	73	10
10	7	73	10
11	7½	72	10
12	8	63	7
13	8½	65	7
14	9	61	6
	(9½ = 9U)	(58)	(5)
15	10½ = 10UH	46	2
16	10	55	4
17	11U	46	2
18	12U	49	2
19	13UH	45	1
20	P	41	0.2
21	14UH = 15	45	1.0
22	A	40	0.1
23	L = >16	44	0.2
24	P	44	0.3

A = fuldstændig afkalkning.
U = begyndende udslettelse af konturerne.
P = central plet (stærkt udviskede konturer).
L = lille plet centralt (næsten helt afkalket).
H = huller i den centrale kalkmasse (optræder oftest sammen med U).
K = kalkinfiltrater (?) (ses kun i H_2SO_3-afkalkede præparater).

Betegnelserne U og H er kun anvendt i røntgenforsøg I + II, i de øvrige forsøg er kun anvendt de rene tal + betegnelserne A, L, P og K.

uforandret under afkalkning), samtidig med at pH-bestemmelserne eventuelt kunne give oplysninger om afkalkningens forløb.

Disse bestemmelser blev foretaget med det af »Radiometer« konstruerede autojonometer, type PHM 21 a, med tilhørende referenceelektrode type K og glaselektrode type R. Apparatets måleskala strakte sig fra pH: 0–14 og skalaen kunne ved omskiften på en knap anvendes til registrering af den opståede spænding i

millivolt fra 0–400. Apparatet var yderst nemt at betjene og aflæsningen af pH- eller millivoltværdierne kunne foregå hurtigt, idet viseren indstillede sig på få sekunder. Gentagne justeringer og gentagne målinger med andre brintionholdige vædsker end den til justeringen beregnede stødpudevædske med pH = 6,5 gav altid det samme pålidelige resultat. Der var højst udsving i pH på $\pm$ 0,1, svarende til eventuel ændring i brintionkoncentration (C_H+) på antilog 0,1, hvilket ikke er ret meget, når man betænker, at der i C_H+ for anvendte syrer er forskelle på indtil 10^4 gange.

Apparatet var opstillet på Rigshospitalets øreafdelings laboratorium, hvor de systematiske, sammenlignende undersøgelser over den afkalkende effekt af forskellige syrer foregik. Det var derfor bekvemt, når knoglepladerne udtoges af glassene til røntgenundersøgelse (Rigshospitalets røntgenafdeling) samtidig at hælde små syreprøver op til måling af pH og millivoltspænding. Så snart prøverne var målt, hældtes disse tilbage i deres respektive glas, for at afkalkningen fremdeles kunne finde sted med konstant mængde vædske.

3. Afkalkende medier.

Forsøgene falder i to afsnit:

1) Afkalkning ved hjælp af en række brintionholdige vædsker valgt på basis af angivelser i litteraturen. Antallet af disse syrer eller vædsker med syrekarakter er talrige, som det fremgår af skemaet side 38. Dette store antal syrer- og syrekombinationer tyder på, at de fleste forfattere, der har beskæftiget sig med afkalkning, ikke har været tilfredse med de bestående metoder. De anvendte syrer har været: 5% salpetersyre, saltsyre, svovlsyre, svovlsyrling, kromsyre og trikloreddikesyre — 10% myresyre, mælkesyre og citronsyre, koncentreret fosforsyre og myresyre — og af blandinger kromsalpetersyre efter *Katz*, salpetersyreformol efter *Werner*, salpetersyrefloroglucin efter *Haug*, salpetersyrealkohol efter *Thoma*, saltsyrenatriumklorid efter *v. Ebner*, trikloreddikesyre-formol, myresyrealkohol, myresyre-citrat efter *Wagoner* og salpetersyre-citrat efter *Sørensen (Holter)*. Disse undersøgelser fandt sted i modelforsøgene I, II, III, IV og V.

2) Afkalkning ved hjælp af en række brintionholdige vædsker, også til en vis grad udvalgt på basis af den forekommende litteratur, men med koncentrationen opgivet i normaliteter. Motiveringen herfor er, at man ikke kan foretage sammenligning mellem syrers styrke (resp. afkalkningstid og nedsættelse af farvbarhed) ved angivelse af syrekoncentrationen i pro cent. Muligheden herfor er større ved angivelse af koncentrationerne i molariteter eller normaliteter. Fordelen er indlysende, når man ved, at der i en a normal opløsning er a gramækvivalenter pr. liter (gramækvivalent = så mange gram af et stof som ækvivalenttallet (summen af de i et ækvivalent indgående atomvægte)), og ydermere ved, at man ved et ækvivalent af en syre forstår den mængde af syren, som indeholder et atom syrebrint, og derfor er ækvivalent med et molekyle natriumhydroxyd. Iøvrigt er syrebrinten de brintatomer, som syren kan afgive, og som giver de sure egenskaber. Vi ved altså, at forskellige a normale syrer er i stand til at neutralisere en a normal natriumhydroxyd fuldstændigt. Når det drejer sig om afkalkning er forholdene ikke så simple, idet vi har at gøre med en heterogen proces (omsætning mellem

et fast stof: knoglevæv med kalksalte og en vædske: forskellige syrer), hvor foruden koncentrationen mange andre forhold spiller en rolle, og ikke mindst forskellige egenskaber ved syrerne har betydning.

Der er intet i vejen for, at man kan arbejde med procentiske angivelser af syrekoncentrationerne, idet disse ved simpel reguladetri kan omregnes til normaliteter. Blot vil der herved fremkomme tal, der ikke uden videre er kommensurable.

Hvorledes fordelingen af den procentiske styrke af en række anvendte syrer ser ud, findes let når man kender vedkommende syrers molekyletal og valenser. De ses i nedenstående tabel.

Tabel VIII

Koncentration i % i forskellige 1 normale syrer

Syre	Molekylvægt	%
HNO_3	63.02	6.3
HCl	36.47	3.6
H_2SO_4	98.08	4.9
H_2SO_3	82.08	4.1
H_3PO_4	98.04	3.3
H_2CrO_4	118.03	5.9
HCOOH	46.02	4.6
CH_3COOH	60.03	6.0
CCl_3COOH	163.48	16.4
$C_2H_4OHCOOH$	90.05	9.0
$C_6H_8O_7,H_2O$	210.08	7.0

Af tavlen kan det ses, at man ved sammenligning af 5% saltsyre og salpetersyre (begge fuldstændigt dissocierede) anvender en for stærk saltsyre og en for svag salpetersyre. Dette forhold er muligvis een af årsagerne til, at saltsyre har fået ord for at være mere vævsbeskadigende (spec. overfor kromatinet) og hurtigere afkalkende end salpetersyren.

De anvendte syrer i forsøgene (røntgenforsøg I–XIV) er de i ovenstående tabel nævnte med undtagelse af svovlsyren, som i de tidligere modelforsøg (I–V) har vist sig at mangle afkalkende egenskaber. Som kontrolobjekt anvendtes de tidligere omtalte knogleplader af en tykkelse på 2 mm, en diameter på 7,5 mm og en vægt på ca. 170 mg, hvis afkalkning fulgtes ved røntgenfotografering med passende mellemrum. I disse forsøg kontrolleredes syrernes indflydelse på farvningen ved hjælp af spec. fremstillede vævsmodeller.

Der anvendtes udelukkende farvning med gallocyaninkromalunlak efter *Einarsons* anvisninger, idet det under mit arbejde som assistent ved Fyns Stifts pathologisk-anatomiske Institut blev mig klart, hvor stor værdi denne metode havde fremfor andre metoder, ved at den var progressivt farvende. En anden stor fordel ved metoden var dens elektivitet overfor Nissl-substansen. Sidstnævnte forhold var af allerstørste betydning for mine undersøgelser over tilstandsændringer i det indre øres ganglier. Ved metodens progressivitet undgik man fuldstændigt muligheden af indførelsen af fejlkilder som følge af subjektivitet under den ellers

nødvendige differentiering. Samme tanke fandtes udtrykt i et arbejde af *Lagerstedt* fra 1947: »Gallocyaninfarvning som en specifik metode til fremstilling af protein-inklusioner i leverceller«.

Metoden er den i 1932 angivne, og farvevædsken fremstilles på følgende måde:

0.15 g gallocyanin koges i 3 minutter med 100 cc. 5% kromalun.

Opløsningen afkøles og filtreres og der tilsættes dest. vand, til volumen atter er 100 cc.

pH af farveopløsningen: 1,8 (millivoltspænding 270).

Farvetid: 24–48 timer, idet dog 24 timer konstant har givet det samme resultat som en farvetid på 48 timer.

Holdbarhed af farvevædsken: Efter *Einarsons* angivelser skulle den anvendte opløsning (svarer til *Einarsons* blanding nr. 9 i dennes fyldige arbejde om nervecellernes indre struktur i Acta Jutlandica, XII, 1) være holdbar i et par måneder. Dog fremhæver *Einarson* på næste side med kursivskrift: »En gallocyanin-kromalunopløsning må aldrig blive gammel; man står sig ved at skifte til en ny for at få et smukt resultat i hvert tilfælde«. Netop i mit arbejde, hvor der er lagt vægt på gallocyaninfarvemetodens progressivitet, har det været af værdi at få opklaret, hvor længe man kunne regne med, at ensartet behandlede kernepræparater udviste samme farveintensitet. Resultatet af en undersøgelse over gallocyanin-kromalunlakkens evne til at bevare sine farvende egenskaber ses i nedenstående tabel, hvor fotometerværdierne er udtryk for farveintensiteten.

Tabel IX

Fotometrisk bestemmelse af gallocyaninens holdbarhed

	Farvedato	Fotometer-værdier	Middeltal
Gallocyanin (18. 9. 47)			
— anvendt	27. 9. 47	11—11	11
— —	2. 10. 47	11—11	11
— —	9. 10. 47	11—	11
— —	16. 10. 47	11—	11
— —	23. 10. 47	16—16	16

Det ses heraf, at det ikke er forsvarligt at anvende farvevædsken længere end 4 uger ad gangen. For at være på den sikre side er gallocyaninen aldrig anvendt længere end 3 uger ad gangen, hvorefter den er blevet udskiftet.

Ved dette forsøg samt ved forsøgene over normale syrers indflydelse på kernefarvbarheden anvendtes specielt fremstillede kernepræparater. Udgangspunktet for fremstillingen af disse præparater var *Marchaks* metode til isolering af kernerne i leverceller med henblik på måling af radioaktivt fosfor.

Der blev anvendt milte fra nyslagtede kalve (fra Københavns flæskehaller). Disse blev i legemsvarm tilstand anbragt i 0° fysiologisk saltvand og behandlet efter *Marchaks* metode: Vævet blev fra det iskolde, fysiologiske saltvand ført til 5 volumina kold, 5% citronsyre, i hvilken vævet blev skåret i småstykker med saks, og derefter henstod i 30 min. ved 2–5°. Vævet blev nu knust i morter og vredet igennem et dobbelt lag tæt linned. Den suspension, der herved fremkom,

blev centrifugeret langsomt i to minutter for at fjerne vævsfragmenter. Den ovenstående suspension blev hældt fra og atter centrifugeret, denne gang med en hastighed af 2400 omdrejninger pr. minut, ialt i 10 minutter. Kernerne fandtes da i bundlaget og cytoplasmatiske fragmenter i de ovenoverliggende, solide lag. Det øverste lag blev hældt fra, hvorpå kernerne atter blev opslemmet i kold, 5% citronsyreopløsning, og atter centrifugeret med 2400 omdrejninger pr. minut i 1–2 min. Proceduren gentoges 5 gange.

Remanensen opslemmedes og centrifugeredes 4 gange for at fjerne citronsyren. De sidste centrifugater opslemmedes i ringe mængde vand, hvorpå der forsøgtes fremstillet forskellige kernemodelpræparater, dels ved at stryge kernemassen ud på objektglas og dels ved at opsuge kerneopslemningen i kapillærrør. Udstrygninger var ikke til at få jævne nok og kunne ikke anvendes til sammenlignende farvningsundersøgelser. Ved opsugning i kapillarrør skrumpede opslemningen stærkt ind, således at heller ikke denne vej var farbar. Det forsøgtes dernæst at fremstille formolfixeret kromatinpapir ved at lade kerneopslemningen suge op i fast, hvidt filtrerpapir af ensartet tykkelse. Ved en prøve på anvendeligheden af dette kromatinpapir (sammenligning mellem farven af ikke imprægneret papir, kromatinpapir og syrepåvirket kromatinpapir) viste forskellene i farvetæthed målt fotometrisk sig at være for små. Denne metode kunne heller ikke finde praktisk anvendelse.

Nyfremstillede kerneudtræk hældtes nu på 4 dværgreagensglas, som centrifugeredes i 10 min. med en hastighed af 3500 omdrejninger pr. min. Glassene med indhold anbragtes i 70% alkohol, og den følgende dag kunne en fast sammensintret, alkoholfixeret vævsprop hældes ud af glasset. Denne førtes gennem alkohol og xylol til paraffin som et almindeligt histologisk præparat og kunne skæres i circulære, ensartede snit på en seriesnitmikrotom. Efter nogle forsøg over den mest egnede snittykkelse viste 20 my tykke snit sig at være i besiddelse af de ønskede kvalifikationer. Snittene monteredes på klare, lige tykke objektglas.

Som kontrol af Nissl-farvningen med gallocyanin anvendtes objektglasmonterede snit af frisk formol-fixeret kalverygmarv (fra Københavns flæskehaller).

Disse objektglasmonterede snit af kalverygmarv tillige med kernepræparaterne kunne let mærkes og anbringes i forskellige syrer, hvor de forblev så længe, som det var nødvendigt for syren at afkalke modelknogleplader fuldstændigt. Når afkalkningen var slut, kunne disse præparater behandles som almindelige, histologiske præparater: Skylles i vand (24 timer), farves med gallocyanin og monteres med balsam og dækglas til senere undersøgelse (sammenligningsmikroskopi eller fotometri med Pulfrichs fotometer).

Ved undersøgelse af ovennævnte syrers afkalkningstid og indflydelse på vævenes farvbarhed foretoges forsøg under forskellige betingelser, for at se hvorledes disse betingelser influerede. Det drejede sig om følgende:

a) forskellig normalitet
b) forskellig temperatur
c) brugte opløsninger
d) forskellig tilsætning til syrerne
e) anvendelse af stødpudeopløsninger
f) anvendelse af elektrolyse

Ved afkalkning med syre eller surt reagerende vædsker har vi som tidligere nævnt med en kemisk proces at gøre. Om en sådan proces ved vi, at koncentrationerne og temperaturen spiller en stor rolle. Koncentrationens indflydelse på den kemiske proces er at fremskynde processen, jo større koncentrationen er. Herefter skulle man forvente, at afkalkning forløb hurtigere ved højere koncentration af de anvendte syrer, men samtidig måtte også forventes, at eventuelle skadelige indflydelser på det organiske væv gjorde sig mere gældende. Sidstnævnte forhold er nok omtalt, men ikke særligt påagtet i litteraturen.

Om temperaturens indflydelse på en kemisk proces ved vi, at den er meget stor. Således er der påvist en stigning af reaktionshastigheden til ca. det dobbelte for en temperaturforhøjelse på 10° (*van't Hoffs* regel). Samtidig er der al mulig sandsynlighed for, at vævsbeskadigelsen tiltager med stigende temperatur. En del forfattere har anført anvendelse af temperatur på 37° under afkalkning. Dette gælder *Jaffe*, *Mc. Namara*, *Murphy & Gore*, *Lillie*, *Murayma & al.*, *Plum & Pindborg* og *Williams*. *Richman*, *Gelfand & Hill* har endog anført, at man skulle lade afkalkningen foregå i et bad af indtil 45°. Det skal dog tilføjes, at *Lillie*, *Plum & Pindborg*, og *Williams* har advaret mod anvendelsen af 37°, idet der herved er fare for vævsdestruktion.

Brugte syrer, d. v. s. syrer, som tidligere har været anvendt til afkalkning, er anvendt for at konstatere, om tilstedeværelse af kalksalte kunne virke beskyttende overfor den senere vævsfarvning. Spørgsmålet kan også opstilles således: Om det forhold, at syrerne har Ca-salte at virke på, spiller nogen rolle for farveresultaterne. For at få et foreløbigt svar på dette, anstilledes 19. 5. 47 og 5. 6. 47 nogle forsøg, hvor saltsyre indvirkede 1) på levervæv alene og på levervæv + et par knogleringe, 2) på kernepræparat alene og på kernepræparat + et par knogleringe. Begge forsøg viste eentydigt, at farvningen var bedst i de ikke syrebehandlede kontrolvæv. Præparater, der var syrebehandlede sammen med knogleringene var mindre gode. Slettest farvede var præparater, hvor alene vævet havde været udsat for syrepåvirkning. Det kunne herefter se ud, som om en forløbende afkalkning til en vis grad virker beskyttende overfor de organiske væv. Mine modelforsøg er derfor anstillede med samtidig anbringelse af rygmarvspræparat, kernepræparat og knogleplade i syre, ihvorvel jeg er ganske klar over, at forholdene under disse betingelser ikke svarer helt til, hvad der finder sted under afkalkning i almindelighed. Metoden er fuldt forsvarlig til bedømmelse af afkalkningstiden. Ved bedømmelsen af vævsfarvningen, kan det kun være en fordel for undersøgelsen, hvis vævene kommer ud for større belastning end ellers; thi hvis man ved undersøgelserne finder syrer, som trods relativt god afkalkende effekt ikke beskadiger vævsfarvningen særligt, skulle man tro, at en sådan syre ikke ville virke mere deletært i virkeligheden.

Under gruppen: Forskellige tilsætninger til syrerne er der tænkt på undersøgelse af en del af de stoffer, som ved tilsætning til syrerne skulle bevirke, at farvningerne blev bedre end ved anvendelse af rene syrer. Herunder er der også tænkt på spørgsmålet: Anvendelighed af vandige contra alkoholiske syreopløsninger, idet der i litteraturen er nogen divergens angående dette spørgsmål. Herunder kommer også spørgsmålet: Anvendelighed af stødpudeopløsninger. Stødpudeopløsninger er kun anført i meget ringe omfang i litteraturen (*Custer*, *Gormsen*, *Lillie*, *Morse*,

Wagoner) og af disse har kun *Lillie* omtalt stødpudebegrebet og dettes eventuelle betydning for afkalkningsprocessen.

Ved stødpudeopløsninger forstår man en blanding af en syre og dens korresponderende base, hvis pH-værdi ligger i nærheden af syrebaseparrets styrkeexponent. Tilsætter man en stærk syre eller base til en sådan blanding (forudsat at den tilsatte syre- eller basemængde ikke er alt for stor), forskydes nok mængdeforholdet mellem syre og base, men reaktionstallet (pH) vil stadig holde sig i nærheden af pK (styrkeexponenten). Fordelen ved anvendelse af stødpudeblandinger er, at man foruden at kunne arbejde ved forskellige pH-værdier (ved forskellige blandingsforhold mellem syren og den korresponderende base) kan holde disse forskellige initial-pH-værdier konstante under afkalkningen, hvilket muligvis har nogen betydning ved de påfølgende farvninger, således som pointeret af *Lillie*.

Anvendelse af elektrolyse er kun omtalt af *Richman, Gelfand & Hill* (1947). Metodens princip var fremskyndet udvandring af de positivt ladede Ca-ioner mod den negative elektrode. Apparatet bestod af en beholder af plastic med låg og huller i siderne, så vædsken let kunne strømme. Der kunne anvendes belysningsstrøm eller strøm fra en akkumulator med en spænding på 6 volt. Afkalkningskarret var af glas, som skulle være ret stort for at undgå skiften af vædsken. Temperaturen skulle ligge mellem 30–45°. Som elektrolytvædske anbefaledes højt ioniserede syrer(!), der gav vandopløselige salte med calcium. Disse gav den bedste afkalkning, hvorimod organiske syrer og deres salte på grund af den ringe ionisations- og ledningsgrad gav ringe afkalkning. Den bedste afkalkning opnåedes ved en blanding af 10% myresyre og 8% (ca. 2 n) saltsyre.

Foruden det nævnte spiller andre forhold en rolle for afkalkningsprocessernes forløb, men dels er virkningen af disse forholdsregler nogenlunde sikker ifølge litteraturen, og dels ville yderligere forsøg hermed bevirke, at arbejdet blev belastet med alt for mange variabler. Der tænkes på spørgsmål som: Skiftning, bevægelse og mængde af afkalkningsvædske, samt beliggenhed af det væv, der skal afkalkes, i syren.

Hvad angår skiftning af afkalkningsvædsken har *Krause, Lang & Hasslhofer, Langeron, Mallory & Wright, Schmorl, Szymonowizc* og *Pritchard* anbefalet hyppig skiftning af afkalkningsvædsken, *Lee, Lorch, Mc. Namara, Murphy & Gore, Manasse* og *Morse* daglig skiftning, *Werner* og *Kristensen* skiftning hver 2. dag, medens *van der Stricht, Politzer, Støhr* og *Møbius* har indskrænket sig til at udtale, at afkalkningsvædsken skulle fornyes.

At skiftning befordrer processen er naturligt, idet man må regne med at en frisk syre virker kraftigere end en syre, hvor der er tæret på beholdningen af brintioner.

Bevægelse af vædsken som fremmende faktor er anbefalet i form af *Thomas* hjul af *Lang & Hasslhofer* og *Romeis* og i form af rystning af *Schmorl* og *Saxén*. Sidstnævnte har konstrueret et rysteapparat til dette brug. Princippet ved rystning er, at det kalkholdige væv hele tiden skal i berøring med ny syre, samtidig med at de uddiffunderende kalksalte skal fjernes. Dette forhold er iøvrigt karakteristisk for heterogene kemiske processer i modsætning til homogene processer.

I arbejder, hvor mængden af den anvendte afkalkningsvædske er omtalt, er der enten anført brug af store mængder *(Jaffe, Langeron, Morse, Pritchard* og

Mallory & Wright), eller hvad der kommer ud på eet, rigelige mængder *(Lang & Hasslhofer, McNamara, Murphy & Gore, Romeis, Schmorl, Szymonowizc* og *Ziegler)*. Forklaringen er, at jo større mængde afkalkningsvædske, der anvendes, des større er den til afkalkningen disponible mængde brintioner.

Ophængning af knoglevævet skulle virke fremmende på afkalkningen *(Langeron Romeis, Werner)*. *Brinch* har anvendt ophængning ved hjælp af gaze, medens *Krause* (efter *Coraini*) har anvendt glashager. Princippet er: Bedre bortdiffusion af de dannede kalksalte.

Et andet forhold, som kunne tænkes at bevirke en nedsættelse af afkalkningstiden er anført af *Wilson*, der anbefalede anvendelse af 20% salpetersyre i vakuum, efter at vævet er affedtet. Metoden er efterprøvet af *Lillie*, der fandt, at metoden intet ydede, heller ikke anvendt på myresyre.

I forbindelse hermed skal omtales et par afkalkningsmetoder, der er baseret på afkalkning under tryk. Den ene metode er omtalt af *Forshufvud*, og består i afkalkning med en blanding af 200 cc. formol, 100 cc. off. salpetersyre og 800 cc. vand i Papingryde med et tryk på 4 atm. Den anden metode er anført af *Lindahl*. Princippet er afkalkning med CO_2 under tryk på 3–4 atm., hvorved CO_2 holdes i opløsning som kulsyre. Begge metoder foregår ret langsomt, men uden luftudvikling. Dette har sin betydning ved *Forshufvuds* fremstilling af tandemaillen, der ved sædvanlig afkalkning sprænges løs af den dannede CO_2. *Lindahls* arbejde har betydning ved fremstilling af histologiske præparater af meget kalkrige havdyr, hvor kulsyredannelsen ellers vilde sprænge vævene fra hinanden.

I mine modelundersøgelser er der foretaget ophængning af knoglepladerne og ribbensstykkerne, og ved støkiometrisk beregning er det sikret, at der var rigeligt syre til at afkalke de små knogleplader.

D. Vurdering af afkalkningen

Under vurdering af afkalkningen falder naturligt følgende forhold:

1) pH-målinger under forløbet af afkalkning med forskellige syrer.
2) Bestemmelse af afkalkningsforløb og -tid for forskellige syrer.
3) Bestemmelse af vævenes farvbarhed efter udsættelse for forskellig syrepåvirkning (herunder også overafkalkning).

1. pH-målinger.

Efter litteraturstudierne vides, at det ved afkalkning efter en nogenlunde rimelig målestok er nødvendigt at anvende syrer, hvorved forstås stoffer som i vandig opløsning reagerer surt (fraspalter H^+-ioner). Det er da naturligt, at man vil vide noget om disse syrers egenskaber. Som mål for en opløsnings surhed plejer man at anvende brintionkoncentrationen (C_H+). Der klæber imidlertid den ulempe ved denne angivelsesform, at man i svagt sure opløsninger kommer til at arbejde med meget små tal (negative potenser af 10), hvorfor det efter *S. P. L. Sørensens* angivelse er fundet mere bekvemt at arbejde med $\div \log C_H+$. Dette tal kaldes brintionexponenten eller reaktionstallet og betegnes med symbolet: pH, hvor pH således i neutralområdet er ca. 7, medens den for en 1 molær opløsning af en stærk syre er 0. For endnu stærkere sure opløsninger kan pH antage negative værdier.

Ved angivelse af pH fås oplysning om den aktuelle surhedsgrad (antallet af frie brintioner), men intet om den potentielle surhedsgrad (antallet af brintioner, der kan frigøres) *(Bjerrum & Gjaldbæk)*. Dette forhold spiller en væsentlig rolle ved afkalkning med de såkaldte svage syrer (ikke totalt dissocierede syrer). Ved titrering kommer denne forskel mellem svage og stærke syrer ikke frem, idet der skal anvendes samme mængde n. natriumhydroxyd til neutralisering af samme mængde saltsyre og eddikesyre af samme normalitet. Forklaringen herpå er, at saltsyren afgiver alle sine brintatomer med det samme, medens eddikesyren først afgiver sine brintatomer som brintioner, efterhånden som titreringen nærmer sig neutralpunktet. Ganske vist gælder i almindelighed, at en vandig opløsning af en syre, der er mere surt reagerende, er stærkere end en opløsning af en anden syre, der er mindre surt reagerende, men det bedste udtryk for syrers styrke er angivelsen af forholdet mellem syre-korresponderende base (f. eks. $HCl \rightleftarrows H^+ + Cl^-$, $H_2SO_3 \rightleftarrows HSO_3^- + H^+$, $CH_3COOH \rightleftarrows CH_3COO^- + H^+$). Definitionsmæssigt benytter man reaktionen i opløsninger, der indeholder ækvivalente mængder af en syre og den korresponderende base, som kvantitativt mål for syrernes styrke. Denne reaktion betegnes ved symbolet pK = dissociationsexponenten. Angiver man reaktionen ved hjælp af brintionkoncentrationen, får man et tal, der kaldes syrens dissociationskonstant og betegnes ved bogstavet K.

I det følgende ses en tabel over pK og K, udtaget for en væsentlig del fra *Landolt-Bjørnstein:* »Physikalisch-chemische Tabellen«, og i mindre grad fra *Hodgman:* »Handbook of Chemistry and Physics«.

Tabel X

Tabel over styrketal (K) og styrkeexponent (pK) ved forskellige syrer

Syrens navn	Styrketal	Styrkeexponent
Salpetersyre	stort	negativ
Saltsyre	ca. 10^{+7}	ca. -7
Svovlsyrling	1.7×10^{-2}	1.77
Fosforsyre	1.0×10^{-2}	2.1
Kromsyre	ikke angivet	ikke angivet
Myresyre	1.8×10^{-4}	3.75
Eddikesyre	1.8×10^{-5}	4.75
Trikloreddikesyre	2×10^{-1}	0.7
Mælkesyre	1.38×10^{-4}	3.8
Citronsyre	8.4×10^{-4}	3.1

Styrketallet (K) vokser med stigende syrestyrke, medens styrkeexponenten (pK) aftager med stigende syrestyrke. Det fremgår, at salpetersyre og saltsyre er meget stærke syrer, dernæst kommer en organisk syre (trikloreddikesyren). Af de resterende syrer er fosforsyre noget svagere end svovlsyrling, men stærkere end de resterende organiske syrer. Myresyre og mælkesyre er praktisk talt lige stærke, men noget svagere end citronsyre. Den svageste af dem alle er eddikesyre, der som syre betragtet i betænkelig grad nærmer sig neutralpunktet.

Dissociationsgraden af syrerne spiller mindre rolle, selv om den ændres noget

ved forskellige normaliteter. I stærke syrer, hvor dissociationen er fuldstændig, kan man fuldstændigt se bort fra dissociationsgradens rolle, og for de svage syrers vedkommende er dissociationen i almindelighed så ringe, at den heller ikke spiller nogen afgørende rolle for syrernes indflydelse på afkalkningen.

Af de nævnte tre faktorer (reaktionstallet, styrketallet og dissociationsgraden) er reaktionstallet (pH) den eneste, man uden vanskelighed kan følge under afkalkningsprocesserne. Spørgsmålet er, om man herved kan opnå oplysninger af betydning for bedømmelse af afkalkningen? Man kan forvente at få visse oplysninger om syrestyrkerne (stigning eller bevarelse af pH under afkalkningen), dels har pH-bestemmelserne ifølge *Lillie* en vis interesse i forbindelse med de senere farveresultater. Endelig kan man ved hjælp af pH søge at få et udtryk for stærke og svage syrers anvendelighed til afkalkning ved at bestemme det pH-område, indenfor hvilket afkalkning er mulig med samtidig bevaren af gode farvningsresultater. Farvemulighederne i relation til pH er af vigtighed for dette arbejde, der netop undersøger muligheden for anvendelse af *Einarsons* gallocyanin i tilslutning til afkalkning.

pH under afkalkning med forskellige syrer under forskellige betingelser ses af pH-tabellerne I, II, IV, V og X og i tavlerne over røntgenforsøg I–XII (undtagen IX) i forsøgsprotokollen. For oversigtens skyld opstilles dette forhold skematisk, idet skemaet indeholder syrens styrkeexponent samt eventuel stigning i pH. Eventuel stigning af pH er angivet i absolutte tal.

Tabel XI

pHs forhold ved afkalkning sammenlignet med styrkeexponenten

Syre	pK	I	II	IV	V	VII	VIII	X	XI	XII
HNO_3	÷	0	0	0.05	0	0	0	0.1	0.1	0
HCl	÷7	0	0	0	0.05	0	0	0.1	0.1	0
H_2SO_3	1.7	0.1	0.15	0.2	0.5	0.05	0.25	0.6	0.05	0.15
H_3PO_4	2.1	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1	0.15	0.3	0.05	0.15
H_2CrO_4	?	0	0.05	0.1	0.1	0	0.1	0.2	0.05	0.05
HCOOH	3.7	0.2	0.25	0.15	0.15	0.2	0.25	0.5	0.35	0.3
CH_3COOH	4.7	0.45	0.55	0.2	0.6	0.65	0.65	0.8	0.8	0.7
CCl_3COOH	0.7	0.1	0.05	0.05	0.05	0	0.05	0.2	0.1	0.05
$C_2H_4OHCOOH$	3.8	0.2	0.25	0.1	0.15	0.15	0.3	0.5	0.3	0.45
$C_6H_8O_7,H_2O$	3.1	0.15	0.25	0.1	0.2	0.15	0.2	0.5	0.2	0.35

I 2 n syrer ved stuetemperatur.
II 1 n syrer ved stuetemperatur.
IV 2 n, brugte syrer ved stuetemperatur.
V 1 n, brugte syrer ved stuetemperatur.
X 1/10 n syrer ved stuetemperatur.
VII 2 n syrer, stuetemperatur, overafkalkning.
VIII 1 n syrer, stuetemperatur, overafkalkning.
XI 1 n syrer ved 33° C.
XII 1 n syrer ved 4° C.

Tallene angiver stigningen af pH fra forsøgets begyndelse til afslutningen.

Af skemaet fremgår, at saltsyre og salpetersyre med negativ pK (altså de stærkeste syrer efter styrkeexponenten at dømme), også er de syrer, som bedst formår at holde uforandret brintionkoncentration ved afkalkning under varierende, men fra forsøg til forsøg ensartede betingelser. Kromsyren, hvis dissociationskonstant ikke er angivet i kemiske tabeller, må efter ovenstående have en styrkeexponent, der ikke ligger langt fra trikloreddikesyrens, måske lidt højere, omkring 1.0. For de øvrige syrers vedkommende ses også udmærket overensstemmelse mellem stigningen i pH under afkalkningen og de respektive syrers styrke udtrykt ved pK.

I relation hertil har det sin interesse at se på pH.s forhold ved forskellige myresyreformiatblandinger sammenlignet med den rene 1 n myresyre med pH på omkring 1.8. Ved at betragte tallene for begyndelses- og slut-pH i røntgenforsøgstabellerne XIII og XIV vil man i forsøg XIII kun se meget små stigninger (for blanding no. 4: 0.25, ellers fra 0.05 til 0.1) og endnu mindre i forsøg no. XIV, hvor der højst forefindes en stigning på 0.05. Gennemgående er pH uforandret, hvor der i den rene 1 n myresyre findes en stigning på omkring 0.25 i de fleste af forsøgene (se tabellen ovenfor). Disse evidente forskelle findes til trods for, at 1 n myresyres pH er 1.7–1.8, medens pH i myresyreformiatblandingerne ligger væsentligt højere, nemlig fra 2.2 til 3.8. Dette er en god illustration af en stødpudes evne til at bevare brintionconcentrationen.

Som det fremgår af pH-tavlerne, er stigningen fra den ene måling til den næste meget lille, således at man ikke har mulighed for at bedømme afkalkningsprocessens forløb ved hjælp af pH.

pH.s betydning for farveresultaterne vil blive omtalt i forbindelse med afsnittet: Afkalkning contra farvning. På dette sted skal lige anføres resultatet af en sammenlignende undersøgelse over pH contra på den ene side afkalkningen, på den anden side farvningen med gallocyanin, for at indkredse det anvendelige pH-område. Det er røntgenforsøg no. VI (31. 7. 47), hvor der tillavedes nogle saltsyre-citrat-blandinger efter skemaet side 144 i *N. Bjerrum*: »Uorganisk kemi« (1947) med pH fra 0 til 4.5. Heri anbragtes objektglasmonterede snit af kalverygmarv, kernesnitobjektglas samt små knogleplader ophængt i tråd. Præparaterne forblev i vædskerne indtil afkalkningen, kontrolleret ved røntgenfoto, var fuldstændig. Herefter skylledes præparaterne i vand og i destilleret vand og farvedes med gallocyanin. For at sikre konstant pH, kontrolleredes denne daglig. Vædskerne udskiftedes, hvis der var blot ringe stigning af pH. Ved undersøgelse af rygmarvspræparaterne i sammenligningsmikroskop fandtes slet ikke Nissl-tegning i de præparater, der havde været i vædsker med pH = 0–0.5. Ved pH = 1 begyndte der at optræde Nissl-tegning, som blev noget stærkere ved pH 1.5. Først fra og med pH = 2 sås ingen tinktorielle forskelle af betydning. For at få en optimal farvning af kromatoide substanser (og kromatin) bør man altså ikke arbejde med vædsker med pH under 2, selv om man på den anden side kan få anvendelige resultater helt ned til pH = 1. Men så afhænger resultatet også i høj grad af den tid, præparatet udsættes for syrepåvirkning.

Forholdet pH-afkalkning og kernefarvning kan bedst anskueliggøres i omstående tabel:

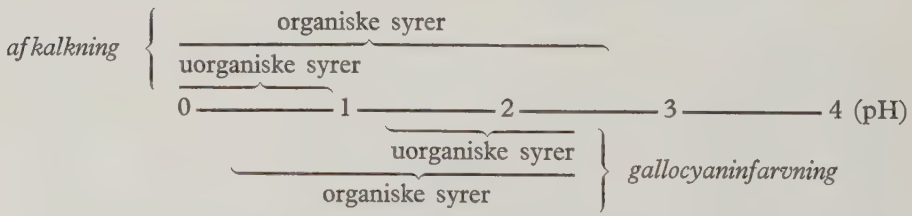
Tabel XII

Forholdet pH—kernefarvning—afkalkning

pH	Afkalkningstider	Fotometri (middelværdier)
0	5 timer	67
0.5	10 timer	39.5
1.0	25 timer	15
1.5	6 døgn	11.5
2.0	>7 døgn	10
2.5		9
3.0	Efter over 7 døgn kun ringe randafsmalning	10
3.5	(i aftagen)	11
4.0		11.5
4.5		13.5

Efter dette forsøg synes det, at man kun kan anvende pH = 1.0. Hvis pH stiger, falder afkalkningstiden meget stærkt, hvis pH falder, kompromitteres kernefarvningen meget kraftigt.

Dette stemmer ikke helt med virkeligheden, idet man godt med uorganiske syrer kan få en afkalkning indenfor en rimelig tid med opnåelse af god kernefarvning (se tavlen over røntgenforsøg II, 1 n H_3PO_4 med pH = 1.2). På den anden side er der ingen tvivl om, at man kan opnå lige så gode afkalkningstider og samtidig god kernefarvning ned til pH-værdier = 0.5 (se tavlen over røntgenforsøg no. IX, hvor man med en 40% myresyre kan opnå en afkalkning på knapt et døgn). Området for brugbar afkalkning og samtidig gunstig kernefarvning er med andre ord væsentligt mindre (og noget kraftigere) for de uorganiske syrer, ikke så lidt større (men mindre kraftigt virkende) for de organiske syrers vedkommende. Ved sammenhold af afkalkningstider og fotometerværdier samt pH for enkelte rene syrer i røntgenforsøg no. IX og X kan man opstille følgende let overskuelige diagram:



Inden afsnittet om afkalkningens forløb og afkalkningstiderne skal omtales nogle indledende knoglepladeforsøg, som iværksattes for at komme til klarhed over den omtrentlige afkalkningstid ved knoglepladerne, de for afkalkningen nødvendige vædskemængder og de pH-områder, indenfor hvilke forskellige syrer stadig var i stand til at afkalke (forforsøg I og II).

Forsøgene fandt sted på Medicinsk-anatomisk Institut (24. 6. 47), og der anvendtes i første forsøg så mange knogleringe sat til syrerne, så der var vished for, at syrerne ville trættes, inden afkalkningen var fuldført. Forsøget blev væsentligst foretaget for at få et indtryk af, i hvor stort et pH-område de forskellige syrer kunne afkalke. Når pH-værdierne i et par dage havde holdt sig konstante, reg-

nedes med, at syrens afkalkende evne var ophørt. Resultatet blev da, at de uorganiske syrer samt trikloreddikesyre afkalkede til pH = 2.4, medens de øvrige organiske syrer afkalkede til pH = 3–4. Svovlsyren afkalkede slet ikke (pH holdt sig uforandret).

(Det må indskydes, at pH-værdierne i dette og det følgende forsøg er lidt for lave. Ved senere kontrolundersøgelser fandtes værdierne 0.3 for lave).

I det andet forforsøg beregnedes støkiometrisk, hvor mange cc. n/10 syre, der var nødvendig for lige netop at afkalke de små knogleplader. Ved beregningen opstilledes følgende ligning, hvor der ikke er taget hensyn til dissociationen i ioner, ejheller til dannelsen af primære fosfationer, ligesom jeg er gået ud fra, at knoglevævet for en overvejende del består af calciumfosfat.

$$\underset{310.28}{Ca_3(PO_4)_2} + 6\,HCl \rightleftarrows 3\,CaCl_2 + \underset{176.08}{2\,H_3PO_4} + \underset{218.82}{6\,HCl} \rightleftarrows \underset{332.97}{3\,CaCl_2}$$

eller som vægten af grammolekyler

a b hvor

$$\frac{a}{b} = \frac{218.82}{310.28} = \text{mængden i g af HCl til hvert g } Ca_3(PO_4)_2.$$

Knoglepladen vejer 170 mg, og heraf er ca. $^1/_3$ $Ca_3(PO_4)_2$ = ca. 50 mg.

Der skal altså bruges $\frac{36.47 \times 6 \times 50}{310.28 \times 1000}$ g HCl = 0.03382 g HCl til en knogleplade,

hvilket nogenlunde svarer til mængden af HCl i 1 cc. n/1: $\frac{36.47}{1000}$

I brøken står, at den nødvendige mængde syre er syrens molekylevægt divideret med 1000. Og dette er netop definitionen på en 1 normal syre, når syren er eensyret. Men også ved to- og tresyrede syrer kommer man på samme lette måde til resultatet. Lad os f. eks. tage en to-syret syre, der kan fraspalte 2 brintatomer. Her er kun det ½ antal grammolekyler nødvendigt til afkalkningen, men til gengæld er syren heller ikke 1 normal før man har anvendt ½ grammolekyle til de 1000 cc. På samme måde med tre-syrede syrer.

1 cc. 1 n syre skulle altså være nok til afkalkning af knoglepladerne.

Da 1 cc. er for ringe mængde, er der i stedet i forsøget anvendt 10 cc. 1/10 n salpeter- og myresyre, hvad der i henseende til det samlede antal frie og bundne brintioner er det samme. Det viser sig, at salpetersyre afkalker i løbet af 3 døgn, medens myresyren efter 1 uges forløb ikke endnu har været i stand til at afkalke, og formentlig slet ikke ville være i stand dertil, da pH var steget ret betydeligt (i nærheden af trætningsværdien).

Indenfor samme forsøg foretoges derpå afkalkning med den 10-dobbelte mængde 1/10 n syrer, hvor salpetersyren var noget kortere tid om at afkalke på grund af den større mængde disponible brintioner, ligesom myresyren nu kunne afkalke af samme årsag. Ved sammenligning med afkalkning ved hjælp af 10 cc. 1 n syrer, hvor den samlede mængde brintioner skulle være den samme, ses der dog væsentlig hurtigere afkalkning — en følge af de større brintionkoncentrationer, som det også afspejler sig i pH.

Jeg vidste herefter, at hvis jeg anvendte et syrevolumen på ca. 100 cc., skulle der være tilstrækkelig syre til at afkalke, også ved anvendelse af 1/10 normale syrer.

2. Afkalkningstid og -forløb.

Efter at have gennemgået litteraturen har man en uklar forestilling om de forskellige, angivne syrers indbyrdes styrkeforhold. Det eneste sikre er, at saltsyre og salpetersyre er hurtigt virkende, og mælke- og citronsyre er langsomt virkende. For de andre anførte syrer gælder, at de har været anført som hurtige, middelhurtige og langsomme, alt efter det objekt, der har været anvendt til afkalkningen. En oversigt over angivelse af syrernes afkalkningshastighed (for rene syrer) ses i nedenstående skema:

Skema VIII

Afkalkningshastighed for rene Syrer

	Hurtig	Middel	Langsom
HNO_3	Mc. Clung, Haug, Herxheimer, Hopewell-Smith, Jaffe, Lang & Hasslhofer, Lee, Lillie, Mallory & Wright, Murayama, Romeis, Schaffer, Ziegler		
HCl	Mc. Clung, Haug, Hopewell-Smith, Jaffe, Lee, Romeis, Ziegler		
H_2SO_3	Lang & Hasslhofer, Lillie, Mallory & Wright, Schmorl, Ziegler	Herxheimer, Jaffe, Schaffer	
H_3PO_4		Ziegler	Haug, Jaffe, Lee, Schaffer
H_2CrO_4			Mc. Clung, Haug, Herxheimer, Hopewell-Smith, Jaffe, Krause, Lee
HCOOH	Langeron, Murayama	Lillie, Romeis, Schmorl	Herxheimer
CH_3COOH	Lee		Hopewell-Smith, Krause, Lillie
CCl_3COOH	Lang & Hasslhofer, Langeron, Murayama	Herxheimer, Lillie, Mallory & Wright, Romeis Schaffer	
$C_2H_4OHCOOH$	Lee		Haug, Ziegler, Krause
$C_6H_8O_7,H_2O$			Jaffe, Ziegler

Det eneste påfaldende i disse angivelser er *Lee's* angivelse af eddikesyre og mælkesyre som hurtige afkalkningsvædsker, og det ret store antal forfattere, der angiver kromsyre som et langsomt virkende afkalkningsmiddel.

Udover *Schaffer* er der ingen, som har beskæftiget sig med undersøgelser over afkalkningshastigheden for forskellige syrer og syreblandinger ved hjælp af ensartede afkalkningsobjekter. *Schaffer* undersøgte den afkalkende effekt ved forskellige syrer, og ved anvendelse af den samme syre i forskellige koncentrationer,

idet han anførte, at det efter *Zachariades* undersøgelser er antallet af syremolekyler i samme volumen, som forårsager de forskellige virkninger af syrer. Efter dette citat er det mærkeligt, at *Schaffer* ikke har taget tanken op og foretaget sine undersøgelser ved hjælp af molære og normale syreopløsninger, men arbejdet med ret tilfældige procentiske styrker. Kun på side 327 arbejder han med syreopløsninger, der er ækvimolære med 5% salpetersyre (se tabel side 31).

Ved en gennemregning af tallene ses disse kun at være delvis rigtige, hvilket sikkert beror på, at de internationale atomvægte har ændret sig fra tidspunktet for *Schaffers* arbejde (1902) til tidspunktet for nærværende undersøgelser.

I sine første forsøg anvendte *Schaffer* som afkalkningsobjekt tilnærmelsesvis lige store, kileformede stykker, udsavede fra calcaneus fra en amputeret menneskefod — fixeret i *Müllers* vædske, skyllet i rindende vand og efterhærdet i stigende styrke alkohol.

For at få holdepunkter for afkalkningstiden ved anvendelse af forskellige syreblandinger, samt for at få noget at vide om derved optrædende volumenændringer af de afkalkede objekter, anvendte *Schaffer* i en anden forsøgsrække nogle elfenbensstifter, der blev fremstillede på drejebænk af så vidt muligt lige stor længde (20 mm) og tykkelse. Vægten af disse stifter svingede mellem 0.432 og 0.416 g, således at største vægtdifferens ikke androg mere end 0.016 g.

Schaffer fandt, at når han lod de tørre elfenbensstifter ligge nogle dage i destilleret vand eller i $^3/_4$% kogsaltopløsning, tiltog deres volumen fra 1.50% til næsten 4%. Endvidere viste det sig, at elfenben ikke var et så ensartet materiale, at det kvældede fuldkommen regelmæssigt. Disse forandringer blev målt ved hjælp af en dækglasmåler.

Endvidere viste det sig, at der i alle forforsøg optrådte kvældning, mindst ved efterbehandling med 5% kalialun. Kvældningen gik imidlertid ved længere tids udvasken (48 timer) i rindende vand noget tilbage (til den procentiske middel for simpel vandoptagelse = 2.395%). Endelig viste det sig, at disse tørre knogler behøvede længere tid til afkalkning end friske knoglestykker.

Herefter anstillede *Schaffer* forsøg, hvor elfenbensstifter blev anbragt i lige store volumina af forskellige afkalkningsvædsker (i *Thomas* vandhjul). Afkalkningen bestemtes ved indstik med tynd insektnål. Efter afkalkningen blev elfenbensstykkerne tørret godt af og målt ved hjælp af dækglasmåler. Betragter man *Schaffers* resultater (tabel IV), ser man, at v. Ebners kogsalt-saltsyreblanding og 20% salpetersyre afkalker hurtigst. Derefter kommer 20% salpetersyre-floroglucin, som tiltrods for indhold af 20% salpetersyre ikke afkalker meget hurtigere end 5% salpetersyre. Sammenlignet med den rene 20% salpetersyre ses, at floroglucintilsætningen forhaler afkalkningen uden at hindre kvældningen. Tilsætning af formalin bevirker på samme måde forhaling af syreafkalkningen.

Trikloreddikesyre og svovlsyrling afkalker langsommere. Langsomst arbejder fosforsyre.

Med undtagelse af fosforsyre, og under visse omstændigheder den stærke salpetersyre-floroglucinblanding, fremkalder samtlige vædsker skrumpning, som bortset fra den stærke alkoholblanding og den uregelmæssigt virkende salpetersyre-floroglucin er mest udtalt for trikloreddikesyre og mindst for formol-salpetersyrens vedkommende.

Stiften forbliver hvid og uigennemsigtig i 5% salpetersyre og saltsyrekogsaltopløsning, medens den i trikloreddikesyre, svovlsyrling og især i fosforsyre viser gennemskinnelighed.

Schaffer har fundet virkningen af stærk alkohol som opløsningsmiddel for syrer højst ejendommelig og uformålstjenlig, idet afkalkningen herved næsten bringes til stilstand (gælder også den af *Thoma* opstillede modifikation af salpetersyre i alkohol). Selv skiften af vædskerne er formålsløs, idet der stadig er overskud af syre til stede. Forøvrigt gælder forholdet også svagere styrker af alkohol, således som forfatteren viser det i tabel VI (side 325). Det ses her, at afkalkningstiden bliver des længere, jo stærkere alkoholen er. Også opløselighedsevnen er nedsat ved anvendelse af alkohol som opløsningsmiddel for syrerne (tabel V), og *Schaffer* ser årsagen deri, at den stærke alkohol hindrer syrerne i at trænge fuldstændigt ind i de kalkholdige væv.

Resten af *Schaffers* undersøgelser er viet efterbehandlingen.

Schaffer har ikke taget noget hensyn til farvbarhed i modsætning til *Murayama, Suzuki & Itoh* (1937), der foretog sammenlignende undersøgelser over afkalkning med forskellige syrer (se side 22a) ved forskellige temperaturer (se tabel V) og registrerede farvbarheden med hæmatoxylineosin.

Tabel XIV

Kopi af tabel V, side 103 i *Murayama's* arbejde

	Tage	Mittlere Temp.	Zimmertemp.	30°	35°	40°	45°	50°	55°	60°
5% ig. Trichlovessigsäure	1	25.0	66.9	80.7	83.9	80.5	87.7	88.3	82.9	84.6
	2	25.6	31.6	18.8	15.3	19.8	12.3	11.7	16.5	15.1
	3	26.9	1.5	0.4	0.6	0.1	0	0	0.6	0.3
	4	26.5	0.1	0.02	0.1	0			0	0
	5	28.7	0	0	0					
	Totale Ca-Menge (mg)		104.5	88.5	83.0	100.3	83.0	67.7	90.2	84.7
5% ig. Salpetersäure	1	25.0	96.9	97.5	97.7	99.3	92.6	98.9	99.7	99.2
	2	25.6	2.8	2.4	2.0	0.7	7.4	1.1	0.3	0.8
	3	26.9	0.01	0.2	0.3	0.1	0	0	0	0
	4	26.5	0.001	0.1	0.2	0				
	5	28.7	0	0	0					
	Totale Ca-Menge (mg)		91.8	91.0	68.5	123.2	107.6	104.3	92.9	84.4

Der blev til forsøgene anvendt lige store knoglestykker (6–8 mm tykke stykker humerus) eller ribben af 5–6 mm's tykkelse. Afkalkningen blev dagligt kontrolleret ved bestemmelse af den udskilte Ca-mængde, og denne regnedes for at være afsluttet, når der ikke længere kunne påvises Ca i afkalkningsvædsken. Trods det, at disse Ca-målinger er foretaget under hele afkalkningen, er der ikke gjort for-

søg på at optegne forløbet for forskellige syrer. Kun afkalkningsslutpunktet har haft forfatternes interesse. Forfatterne fandt, at afkalkningstiden for salpetersyre (2.5%) og trikloreddikesyre (10%) var 10 dage, for myresyre (25%) 19 dage, og for svovlsalicylsyren (5%) 22 dage.

Afkalkningstiden i mine første modelforsøg (I, II, IV og V) er allerede omtalt på side 62, hvorfor kun skal gengives resultaterne af modelforsøg II og det nærmest efterfølgende modelforsøg III.

Tabel XV

Afkalkningstider i modelforsøg II og III
(døgn eller timer)

Salpetersyre, 5 %	22 timer	Kromsalpetersyre	24 timer
Saltsyre, 5 %	22 timer	Salpetersyreformol	24 timer
Svovlsyrling, 5 %	46 timer	Salpetersyre-floroglucin	2 døgn
Svovlsyre, 5 %	÷ afk.	Salpetersyrealkohol	÷ afk.
Fosforsyre, conc. (I)	÷ afk.	Saltsyre-kogsalt	40 timer
Kromsyre, 5 %	3 døgn	Triklor-formol	3 døgn
Myresyre, 10 %	46 timer	Myresyre-citrat	4 døgn
Trikloreddikesyre, 10 %	3 døgn	Myresyre-alkohol	ikke afk.
Mælkesyre, 10 %	7 døgn	Salpetersyre-citrat (I)	ikke afk.
Citronsyre, 10 %	5 døgn		

Det ses, at der er udmærket overensstemmelse mellem de af *Schaffer* og *Murayama & al.* angivne resultater, at de forskellige tilsætninger til syrerne virker forhalende på den endelige afkalkning, og at alkoholiske syreblandinger er helt ude af stand til at give fuldstændig afkalkning.

Resultatet af hovedforsøgene med modelknogleplader er i henseende til afkalkningstid illustreret af nedenstående skema:

Tabel XVI

Afkalkningstiderne ved forskellige syrer under forskellige betingelser

Syrer	2 n ubrugt stuetemp. Rtg. fors. I	1 n ubrugt stuetemp. Rtg. fors. II	2 n brugt stuetemp. Rtg. fors. IV	1 n brugt stuetemp. Rtg. fors. V	2 n ubrugt overafkalkn. stuetp. Rtg. fors. VII	1 n ubrugt overafkalkn. stuetp. Rtg. fors. VIII	1/10 n ubrugt stuetemp. Rtg. fors. X	1 normal ubrugt 33° Celsius Rtg. fors. XI	1 n ubrugt 4° Celsius Rtg. fors. XII
HNO_3	6.45	6.10	5.40	6.30	5.00	5.50	23.40	4.40	9.30
HCl	6.45	6.10	5.40	6.30	5.00	5.50	24.30	4.40	9.30
H_2SO_3	19.30	29.10	36.30	73.30	13,30	28.10	7½ d	23.00	32.50
H_3PO_4	26.45	42.30	24.50	48.00	23.10	30.10	9½ d	43.10	60.10
H_2CrO_4	11.30	19.40	13.10	24.50	10.50	18.50	52.20	12.10	21.10
HCOOH	26.45	36.50	24.50	36.20	24.10	33.50	5½ d	31.30	60.10
CH_3COOH	8 d		>1 uge	10 d	7½ d	>9 d	>12 d	8 d	>13 d
CCl_3COOH	3½ d	19.40	74.00	24.50	72.20	15.30	32.00	15.00	25.00
$C_2H_4OHCOOH$	52.00	52.20	48.10	57.50	47.10	50.40	7½ d	43.10	7½ d
$C_6H_8O_7,H_2O$	6 d	6½ d	121.20	7 d	7 d	7 d	12 d	7 d	10½ d

d = døgn. Hvor intet andet er anført, er tiderne for afkalkningen anført i timer og minutter.

Det ses straks, at der fra forsøg til forsøg er god overensstemmelse mellem tiderne, meget bedre end tilfældet var for de oprindelige modelforsøg med menneskeribben. Når tiderne i forsøg I og II for alle syrer (undtagen citronsyre) er noget længere end i de tilsvarende, som kontrol gældende, forsøg VII og VIII, skal det pointeres, at der i sidstnævnte forsøg ikke fotograferedes så ofte som i de to førstnævnte. Der fotograferedes mest omkring det forventede tidspunkt for afkalkningen. Dette medførte, at knoglepladerne i sidstnævnte forsøg ikke nær så ofte skiftedes fra syre til vand og fra vand til syre. Dette er årsagen til de kortere afkalkningstider i forsøgene VII og VIII, idet man må regne med, at der efter hver fotografering medgår en vis tid, inden syrerne atter har fuld afkalkende effekt.

a. Ved anvendelse af 2 normale syrer er rækkefølgen med henblik på afkalkende effekt: Salpetersyre = saltsyre, kromsyre, svovlsyrling, fosforsyre = myresyre, mælkesyre, trikloreddikesyre, citronsyre og eddikesyre. Ved anvendelse af 1 normale syrer kommer den samme rækkefølge frem med undtagelse af, at afkalkningstiden for trikloreddikesyre er afkortet med ca. $^1/_4$–$^1/_5$. Dette forhold går igen i forsøgene VII og VIII, og kan ikke dreje sig om et tilfældigt fund. Samme forhold, at en stærkere syre afkalker langsommere end en mere fortyndet syre genfindes i røntgenforsøg IX, hvor afkalkningstiden er kortest for 20% myresyre (15 timer), bliver længere ved anvendelse af 40% myresyre (21 timer) og væsentligt længere ved anvendelse af koncentreret myresyre (7 døgn). Dette stemmer med fundene i de første modelforsøg, hvor koncentreret myresyre og fosforsyre praktisk talt ikke havde nogen afkalkende virkning, men kun macererede vævenes organiske bestanddele. Endelig stemmer det med, at afkalkningstiden for 3 n HNO_3 i røntgenforsøg XIV er længere (ca. 9 timer) end i røntgenforsøg I og II, hvor tiderne lå omkring 6 timer. I dette forhold må man sikkert søge årsagen til, at *Herxheimer*, *Lillie*, *Romeis* og *Schmorl* ikke har kunnet klassificere den rene myresyres afkalkende effekt højere end middel eller derunder. De har nemlig arbejdet med stærke, overvejende koncentrerede opløsninger. *Murayama & al.* fandt derimod afkalkningstiden ret kort ved anvendelse af en 25% myresyre. *Schaffer* har ikke undersøgt myresyrens afkalkende virkning.

Afkalkningslitteraturen giver ingen forklaring på dette forhold. Måske er forklaringen det i *Rings* kemi omtalte forhold, at man skulle forvente, at en omsætning mellem en syre og et metal gik hurtigere for sig, når syren var mere koncentreret. Imidlertid viser det sig, at 3% svovlsyre langt hurtigere kan opløse et stykke zink, end svovlsyre, der er mere koncentreret. Dette vil med andre ord sige, at fortyndet syre godt kan være stærkere virkende end samme syre i koncentreret tilstand, når man dermed mener, at den hurtigere opløser metaller. Da afkalkningen i virkeligheden er en opløsning af et metal ($Ca^{\cdot\cdot}$) i syrer, er det nærliggende at slutte, at de samme regler gør sig gældende her.

Den egentlige forklaring er muligvis den af *Henriques* fremsatte: »I en koncentreret, ren opløsning hæmmes ionernes aktivitet, fordi en del af deres elektriske ladning beslaglægges ved indbyrdes tiltrækninger. I en fortyndet opløsning, hvor ionernes elektriske ladninger får lov til at udfolde sig uhindret, svarer den aktivitet, vi kan måle, til ionkoncentrationen«. Da man ved afkalkningen i allerhøjeste grad må regne med ionaktivitet, er det ikke usandsynligt, at ovenstående forklaring

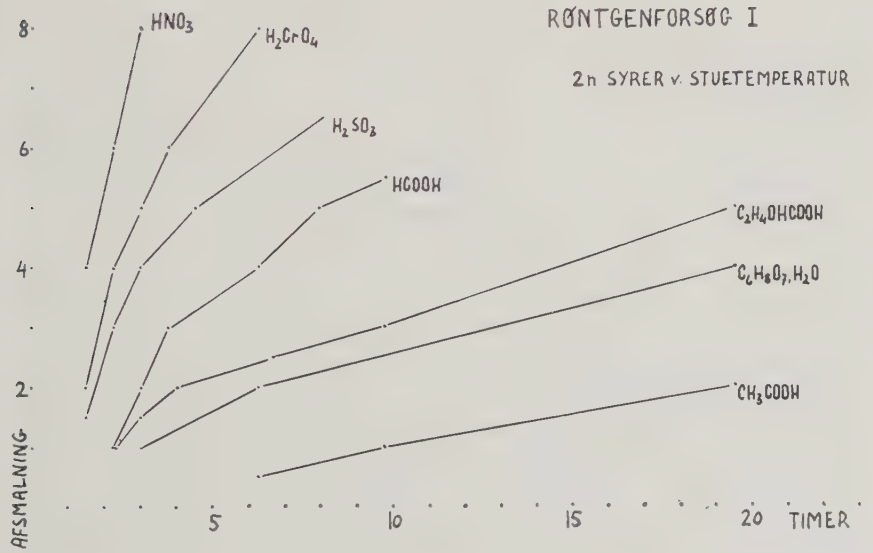
også er den gyldige, når det drejer sig om anvendelse af fortyndede contra koncentrerede syreopløsninger ved afkalkning.

Dette forhold var den direkte anledning til undersøgelse af afkalkningstiden for forskellige koncentrationer af myresyre (den syre som hidtil viste de relativt bedste afkalknings- og farveresultater). I tavlen over røntgenforsøg IX ses det utvetydigt, at 20% myresyre er hurtigst afkalkende, idet afkalkningstiden tiltager ved højere eller lavere koncentration af myresyren. Ved højere koncentration af myresyren fås udtalt maceration af knoglevævets organiske bestanddele, samtidig med at afkalkningsevnen er overordentligt ringe.

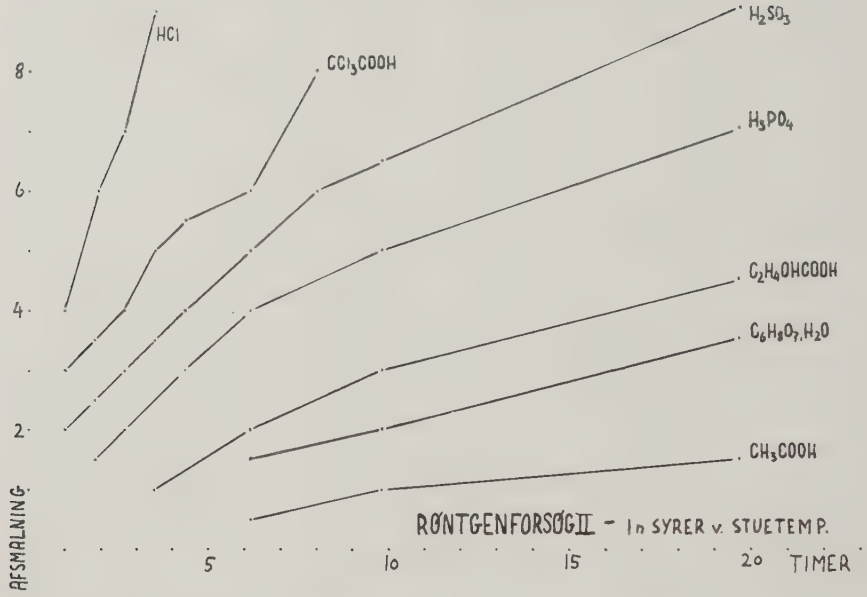
Ved anvendelse af 1/10 normale opløsninger ses syrernes fordeling efter afkalkningshastighed den samme som ved anvendelsen af 1 normale syrer, blot er trikloreddikesyre noget hurtigere end kromsyren. Iøvrigt ses, at samtlige tider er blevet væsentligt forlængede i dette forsøg i forhold til tiderne ved anvendelse af 1 normale syrer. Da brintionkoncentrationen er formindsket med 1/10, idet den yderligere dissociation af de svage syrer som følge af fortyndingen alligevel er forsvindende, må *dette forhold ses som et tydeligt bevis for brintionkoncentrationens indflydelse ved afkalkningen.*

Brintionkoncentrationen er ikke den eneste faktor af betydning for afkalkningen. Dette fremgår ved betragtning af afkalkningstider indenfor de enkelte forsøg. Trods det alle opløsninger er fremstillede med indhold af samme mængde gramækvivalenter pr. liter, er der et stort spring i afkalkningstid for den hurtigst og langsomst arbejdende syre. Dette beror på forskel i syrernes styrke og illustreres bedst af følgende diagrammer over afkalkningens forløb målt ved hjælp af knoglepladernes randafsmalning på røntgenpladerne.

Figur 3.
Diagram over røntgenforsøg I.



Figur 4.
Diagram over røntgenforsøg II.



Disse diagrammer er i nøje relation til afkalkningstiderne i røntgenforsøg I og II, og viser stort set den samme forløbsretning for syrerne med undtagelse af trikloreddikesyre. Dennes forløb er mere stejlt i forsøg II end i forsøg I, hvor dens forløb skal ligge mellem myresyren og mælkesyren. Iøvrigt må det noteres i forsøg I, at forløbet for saltsyre er det samme som for salpetersyre og for fosforsyre det samme som for svovlsyrling. I diagram II løber salpetersyrens kurve sammen med saltsyrens, kromsyrens følges med trikloreddikesyrens, og fosforsyrens kurve følges med myresyrens. Syrens styrke er illustreret på den måde, at jo stejlere forløb (større vinkel med abscissen) des stærkere virker syren afkalkende, jo fladere forløb (mindre vinkel med abscissen), des svagere virker syren. Samtidigt fremgår det af diagrammerne, at de til forsøgene valgte syrer nogenlunde dækker registeret af syrestyrker ind, idet forløbsretningen af de forskellige syrers diagrammer fordeler sig jævnt i området mellem den stærkest og svagest afkalkende.

Forklaringen på, at syrer af samme koncentration afkalker forskelligt, må ligge i forhold, som influerer på brintionkoncentrationen. Det eneste forhold af betydning er syrernes dissociation, men herudover kan syrernes og de tilsvarende kalksaltes molekylstørrelser og diffusionshastigheder antages at spille nogen rolle. Opløseligheden af de forskellige Ca-salte kan næppe tænkes at spille nogen rolle, da opløselighedsproduktet for de kalksalte, det kan dreje sig om, aldrig nås i de sure opløsninger, vi har at gøre med ved afkalkning.

Molekylstørrelse og diffusionshastigheder af syrerne og disses kalksalte er af mere problematisk værdi ved grupperingen af syrer efter afkalkende egenskaber. Helt anderledes er det med dissociationsgraden af de forskellige syrer i vandig

opløsning, hvorved forstås den procentiske fordeling af brintioner og syrerestioner i opløsningen. Der findes nemlig syrer, der så godt som fuldstændigt fraspalter deres syrebrint som brintion. Sådanne syrer kaldes stærke. Eksempler herpå er netop de syrer, der i mine forsøg har vist de største afkalkende evner (saltsyre og salpetersyre). Svovlsyren hører også til denne gruppe syrer, men dannelsen af uopløselig gips ophæver den afkalkningsevne, en sådan syre ellers burde besidde.

Syrer, der ved opløsning i vand kun fraspalter få brintioner, altså er lidet dissocierede, kaldes svage syrer. Hertil regnes eddikesyre, mælkesyre og citronsyre. Overgangen dannes af de middelstærke syrer, der kun er delvis ioniserede, omend mere end de svage syrer. Hertil hører svovlsyrling, der i 0.1 mol. opløsning er 34% dissocieret, og fosforsyre, der i 0.1 mol. opløsning er 24% dissocieret, samt trikloreddikesyre og myresyre, hvor trikloreddikesyren er noget stærkere dissocieret end fosforsyre og svovlsyrling, medens myresyren er noget svagere dissocieret end disse syrer.

Dissociationsgraden for eddikesyre er i 1.33%, hvilket vil sige, at syren er så godt som udissocieret.

Et forhold, hvis betydning for afkalkningshastigheden er lige så vanskeligt at bedømme som molekylstørrelser og diffusionshastigheder, er dannelsen af komplekse Ca-salte. Dette er tilfældet for mælke- og citronsyrens vedkommende, men der er næppe tvivl om, at det spiller en underordnet rolle i forhold til syrernes dissociation med heraf følgende forskellig mængde brintioner disponible til afkalkningen.

b. *Temperaturens indflydelse* skulle, for så vidt *van't Hoffs* regel kan overføres på afkalkningen, være den, at afkalkningen skulle foregå 2–3 gange hurtigere for hver 10 graders opvarmning, medens den omvendt skulle foregå ca. halvt så hurtigt ved en tilsvarende afkøling. Af skemaet over afkalkningstiderne for 1 normale syrer (se side 87) kan det ses, at såvel opvarmningen som afkølingen kun formindsker, respektive forlænger tiden med ca. det ½ af den for stuetemperatur gældende. Forklaringen er, at vi ved afkalkning har med en heterogen proces at gøre, hvor berøringsfladerne mellem de reagerende medier er forholdsvis små i forhold til berøringsfladerne ved homogene kemiske processer (kemiske processer mellem vædsker). Da det er de homogene processer, *van't Hoffs* regel gælder, er det ikke mærkeligt, at afkalkningstiderne ved stigning eller fald af temperaturen kun viser forholdsvis små ændringer. Høj eller lav temperatur bliver derfor kun af ret ringe værdi for afkalkningstiden.

Af *Murayama & al.'s* forsøg med forskellige temperaturers indflydelse på afkalkningen er den tidligere refererede tabel V, side 86, den mest illustrerende. Der er i denne opstillet de dagligt udtrukne mængder Ca^{++} for 5% trikloreddikesyre og 5% salpetersyre ved forskellige temperaturer. Samtidigt kan man se afkalkningstidens forhold til temperaturvariationerne. Det viser sig i disse forsøg, at først en stigning af afkalkningstemperaturen på 30 grader (55° C.) gav en omtrentlig fordobling af syrernes aktivitet.

c. Begrundelsen for mine *forsøg med brugte syreopløsninger* er i korthed følgende:

At skabe klarhed over den rolle, det spiller for de senere farveresultater at anvende brugte syreopløsninger (syreopløsninger der allerede har været anvendt til afkalkning). Men samtidigt er det lige så vigtigt at få konstateret, om brugte opløsninger har samme afkalkende effekt som ikke brugte opløsninger. Af tabellen over de samlede afkalkningstider for knoglemodelforsøgene (side 87) ses, at afkalkningstiderne i 2 normale og 1 normale brugte opløsninger gennemgående er længere end de tilsvarende 2 og 1 normale, ubrugte opløsninger, med undtagelse af 2 n brugt salpeter- og saltsyre. Forklaringen herpå er, at knoglepladerne i røntgenforsøg IV kun er fotograferede (skiftet fra syre til vand og atter til syre) ialt 3 gange, medens de i det tilsvarende røntgenforsøg I er fotograferede ialt 6 gange. Forlængelsen af afkalkningstiderne er imidlertid som helhed uvæsentlig med undtagelse af svovlsyrlingen, hvor afkalkningstiden i begge forsøg bliver næsten fordoblet ved anvendelse af brugt syreopløsning. I denne sammenhæng er det interessant at bemærke *Schaffers* udtalelser til tabellen VII, side 31, hvor han ved sine forsøg over forskellige syrers opløsende evne overfor knoglesalte fandt, at svovlsyrlingen ret hurtigt opløste en vis, ringe mængde knogleaske. Allerede ved tilsætning af 0.9% knogleaske kom der copiøse udfældninger. Noget tilsvarende har jeg konstateret ved trætningsforsøg på syrer. Disse forsøg foretoges på den måde, at der til syrerne sattes et overskud af knogle i forhold til syremængden. Herved kom der meget hurtigt udfældninger i glasset med svovlsyrling, og forholdet skyldes reducerende egenskaber hos svovlsyrlingen. Denne er i stand til at forbinde sig med luftens ilt under dannelse af svovlsyre efter følgende ligning:

$$H_2SO_3 + O \rightarrow H_2SO_4$$

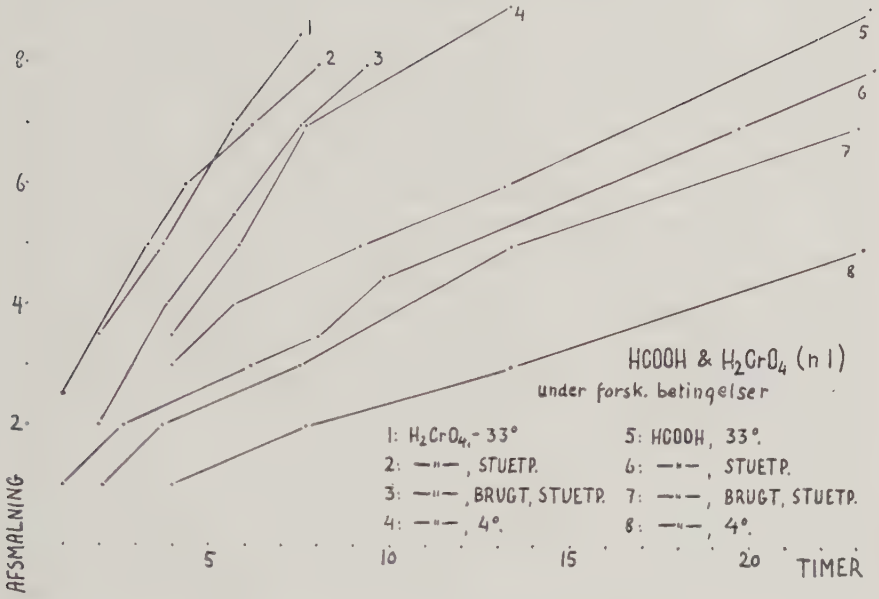
Da mine første modelforsøg viste, at svovlsyren ikke besad afkalkende egenskaber tiltrods for dens udtalte syrekarakter, formentlig på grund af dannelse af det uopløselige kalciumsulfat (gips), er der næppe heller tvivl om, at de som kalkinfiltrater registrerede, skyggegivende udfældninger på røntgenpladerne, udelukkende fundet i knogleplader, som har været afkalket i svovlsyrling, og mest i de brugte opløsninger, er udfældninger af gips forårsaget af den af svovlsyrlingen dannede svovlsyre. Forklaringen stemmer nøje med, at udfældningerne er langt mest udtalt i forsøg med brugte syreopløsninger, hvor der er mere Ca til stede end i ikke brugte opløsninger, og hvor der også er en større chance for tilstedeværelse af svovlsyre. Alene på grund af dette forhold er *svovlsyrlingen ikke særligt anbefalelsesværdig som afkalkningsvædske.*

Forlængelsen af afkalkningstider ved anvendelse af brugte syrer er størst ved de organiske syrer. Dette passer med, at der for disse syrers vedkommende har fundet en stigning sted i pH, som ikke har gjort sig gældende for de stærke syrers vedkommende.

Diagram III illustrerer for en typisk repræsentant for de stærkere og svagere syrer: Kromsyre og myresyre, afkalkningens forløb ved anvendelse af ubrugte og brugte opløsninger. Det fremgår tydeligt, at kurvernes forløbsretning ikke ændres. Det eneste, der sker, er at kurven forløber noget lavere, hvilket vil sige, at afkalkningstiden er noget længere.

Samtidigt illustrerer kurverne temperaturens indflydelse på afkalkningens for-

Figur 5.
Diagram III



løb ved de samme to syrerepræsentanter. Det ses ligeledes, at syrernes afkalkningsmodus er den samme (kurverne praktisk taget parallelle), og det ses, at temperaturens indflydelse er størst ved de organiske syrer, og i særlig grad gør sig gældende ved afkalkningen ved lav temperatur.

d. *Anvendeligheden af alkoholiske contra vandige syreopløsninger* er åbenbart ikke sikkert klarlagt, når *Werner* i sin sammenfattende bog om labyrinthundersøgelser under afsnittet afkalkning refererer til *Hagens* (1930) angivelse af 1–2% alkoholisk salpetersyre som afkalkningsmiddel, til trods for at *Schaffer* allerede 1902 har vist, at alkoholiske syreopløsninger er længere om at afkalke end de vandige opløsninger, og til trods for at *Jaffe* (1929) har anført, at der er eksperimentelt bevis for, at en 5% opløsning af salpetersyre i alkohol kun er 1/5 så effektiv som den tilsvarende vandige opløsning. *Busch* (1877) anvendte som argument for anvendelsen af de alkoholiske syreopløsninger, at disse hindrede de kvældninger, som ellers fremkom ved anvendelse af vandige syreopløsninger. *Thoma* (1891) angav som afkalkningsmiddel 5 rumdele 95% alkohol og 1 rumdel koncentreret salpetersyre, om hvilket afkalkningsmiddel *Ziegler* (1899) forøvrigt skrev, at det gav en ret hurtig afkalkning, men samtidig celleskrumpning og slet farvbarhed, ligesom knoglestykkerne blev helt skøre. *Morse* (1945) angiver i almindelighed med beklagelse den udstrakte anvendelse af salpetersyre i 2–8% opløsninger (vandige eller alkoholiske — med eller uden tilsætning af floroglucin). *Lillie* (1944) fandt ingen afkalkende effekt af betydning for 80% alkoholiske opløsninger af 25% myresyre, 25% eddikesyre eller 10–20% salicylsyre, ligesom der heller ikke fandtes

nogen afkalkende effekt af Carnoys vædske. I sidstnævnte vædske har jeg heller ikke konstateret afkalkende effekt på et stykke menneskeribben opbevaret i mere end 1 år.

Egne undersøgelser over afkalkningstiderne for alkoholiske syreblandinger er ikke mange, men til gengæld eentydige. Det drejer sig om forsøg med salpetersyrealkohol efter *Thoma* samt myresyrealkohol i modelforsøg III, samt forsøg over anvendeligheden af 1 normale alkoholiske opløsninger af myresyre og salpetersyre (røntgenforsøg IX). I de første forsøg er der ikke konstateret nogen afkalkning i det hele taget. I sidste forsøg er der ved røntgenundersøgelse fundet nogen randafsmalning af knoglepladerne, idet det dog til sammenligning skal anføres, at afsmalningen i de tilsvarende 1 normale syrer i røntgenforsøg I og II viser, at myresyrealkoholpræparatets afkalkning efter 1 uge svarer til, hvad der med den vandige 1 normale myresyre er opnået på 19½ time. På tilsvarende måde ses, at hvad der er opnået af afkalkning med alkoholisk salpetersyre efter 1 uge, med den vandige 1 normale salpetersyre er opnået på 3 timer. Om alkoholens hæmmende indflydelse på afkalkningen er der altså slet ingen tvivl.

Schaffer mente, at denne hæmmende indflydelse kunne bero på, at alkohol kun tillod syren at trænge ufuldstændigt ind i knoglevævet. Hvis *Schaffer* hermed har ment, at alkohol var et dårligt opløsningsmiddel for syrerne, har han haft ret. Vandets særlige evne til at opløse salte står i forbindelse med dets store dielektricitetskonstant (D = 80), idet stoffer med stor dielektricitetskonstant virker tiltrækkende på ioner. Vandet er et ionofilt opløsningsmiddel, hvilket ikke alene viser sig ved vandets evne til at opløse salte, men også derved at svage elektrolyter er langt stærkere ioniserede i vand end i andre opløsningsmidler. I sammenligning hermed er dielektricitetskonstanten for alkohol kun 26, hvilket vil sige, at alkohols ioniserende virkning overfor syrer er væsentlig ringere end for vands vedkommende. Forholdet kan måske desuden forklares ved betragtning af følgende ligning:

$$HCl + C_2H_5OH \rightleftarrows Cl^- + C_2H_5OH_2^+,$$

hvor alkoholen ved sammenblanding af syre og alkohol fungerer som en svag base, og hvorved der dannes den i forhold til HCl langt svagere $C_2H_5OH_2^+$.

Om man herefter kan anvende alkoholiske afkalkningsvædsker, bliver i virkeligheden et spørgsmål om de farveresultater, metoden yder.

I litteraturen er der delte meninger om betimeligheden af anvendelse af tilsætning af forskellige stoffer til syreopløsningerne for at nedsætte syrernes vævsbeskadigende virkninger. *Haug* og *Andeer* anbefalede hver for sig anvendelse af floroglucin sat til salpetersyre, idet der herved opnåedes en kort afkalkning uden skadelige indflydelser på vævsfarvbarheden, til trods for at den anvendte syre var ret stærk. *Schmorl* anbefaler *v. Ebners* saltsyre-kogsaltblanding. I modsætning hertil udtaler *Ziegler*, at *Haugs* og *Andeers* blandinger har været ham en skuffelse, ligesom *Williams* også har været skuffet over disse blandingers anvendelsesmuligheder. *Jaffe* udtaler, at man er tilbøjelig til at gå bort fra disse tilblandinger, *Krause*, at disse tilsætninger skader afkalkningen, og *McClung*, at hverken salt, alkohol eller kromsyre er i stand til at hindre syrernes skrumpende eller kvældende indflydelse. *Schaffer* har i sit arbejde (1902) søgt at rydde lidt op i forholdene. Han fandt da, at disse forskellige tilsætninger ikke havde anden virk-

ning end at forhale afkalkningen. Når *Schaffer* med sine undersøgelser som ballast gik positivt ind for en anvendelse af rene syrer fremfor syreblandinger, kan det ikke undgå at undre, i hvor udstrakt grad der fremdeles anvendes syreblandinger, specielt blandingen salpetersyreformol *(Falbe-Hansen, Juul & Vraa-Jensen, Kristensen, Mygind & al., Møbius, Mallory & Wright, Werner* og *Wittmaack* samt *Wada)*.

I de indledende modelforsøg repræsenterer modelforsøg II en undersøgelse over disse forhold, og det vil ses, at afkalkningstiderne i disse forsøg er længere end for de tilsvarende rene syrer i de nærmest forudgående forsøg (I og II), og det til trods for at tiderne fra forsøg til forsøg viser en nedadgående tendens og til trods for, at de anvendte syrer i syreblandingerne er stærkere end i de tilsvarende rene syreopløsninger.

Der er derfor ikke gjort meget ud af dette i knoglepladeforsøgene, udover at der i røntgenforsøg IX er indsat nogle forsøg over afkalkningstid for salpetersyre-formalin, salpetersyre-floroglucin, for myresyre-citrat og myresyre-formiat. Ved sammenhold af tiderne for disse blandinger med tiderne i røntgenforsøg VIII (1 normale, ubrugte syrer) ses det umiddelbart, at tiderne er forlængede i syreblandingerne, idet tiderne for

HNO_3 = 5.50 timer og for HNO_3-formol: 6.30, HNO_3-floroglucin = 5.40.

HCOOH = 34 timer, HCOOH-citrat = 42 timer, HCOOH-formiat = 38 timer.

Forlængelsen er for floroglucin-salpetersyrens vedkommende kun relativ (i blandingen er salpetersyren 10%, i den 1 normale opløsning kun ca. 6%), for de andre blandingers vedkommende er den umiddelbart synlig og andrager ikke så lidt for salpetersyre-formalinens vedkommende.

For myresyrens vedkommende ses den største forlængelse i myresyre-citrat-blandingen til trods for, at der i denne blanding er lige dele koncentreret (85%) myresyre og 20% natriumcitrat, medens der i myresyre-formiat-blandingen er lige dele 10% myresyre og 1 normal (ca. 7%) natriumformiat.

Myresyre-citrat-blandingen, som har vundet stort indpas i Amerika, er først lanceret af *Evans & Krajian* (1930), der ved sammenligning med salpetersyre fandt, at den førstnævnte var salpetersyre meget overlegen. Det mest fremtrædende var, at de cellulære elementer var praktisk talt uafficerede og tog imod farve så godt som væv, der ikke havde været underkastet afkalkning. Iøvrigt mente forfatterne i modsætning til *Jaffe* (der havde fundet myresyren utilfredsstillende på grund af tendens til svulst af bindevævsfibrillerne), at denne vædske ikke fremkaldte svulst af vævet. Denne virkning blev hovedsagelig tilskrevet den tilsatte natriumcitrat. Den næste publikation af undersøgelser over afkalkningen med denne blanding var *Wagoners* (1931), der iøvrigt ved samme lejlighed fremhævede, at man kunne opnå akkurat bedømmelse af afkalkningen ved daglig bestemmelse af brintionkoncentrationen i opløsningen. Det næste arbejde var *Custers*, der med denne metode fandt gode resultater ved den histologiske undersøgelse af afkalket knoglemarv. Arbejdet dannede grundlag for *Gormsens* undersøgelser af knoglemarven i disputatsarbejdet fra 1942. Det næste omfattende arbejde kom fra *Lillies* hånd (1944) og det sidste fra *Morse* (1945).

Udgangspunktet for *Lillies* arbejde dannedes af ønsket om en forbedring af

afkalkningsmetoderne med henblik på en forbedret farvning af den afkalkede knoglemarv med *Romanowsky*-farvningen. Idet det var forfatterens mening, at man ved at kontrollere den initiale pH, kunne kontrollere knoglemarvsfarvningen, fremstillede han serier af stødpudeblandinger af myresyre og svovlsyrling, idet der som puffer anvendtes primære og sekundære fosfater samt citrater. Af disse gav svovlsyrling-natriumcitrat ikke særligt gode resultater, heller ikke de puffede myresyre-blandinger var særligt opmuntrende, hvorfor forfatteren er mest tilbøjelig til at anvende 5% myresyre som rutineafkalkningsmetode. Den anbefales også i den af forfatteren nyligt udgivne håndbog (1947).

Da man ved disse tilsætninger af forskellige stoffer til syrerne enten ikke ved, hvad der sker i kemisk henseende (formol-salpetersyre, -floroglucin-salpetersyre), eller ikke nøjagtigt ved, hvad der sker i kemisk henseende (i blandingen myresyre-citrat driver den stærkere syre, myresyre, den svagere syre, citronsyre, ud, så vi får en tilfældig blanding af myresyre, citronsyre, natriumformiat og natriumcitrat), var det mit formål at nå frem til en afkalkningsvædske, hvis kemiske egenskaber var kendte og kunne kontrolleres.

Det var i samtlige røntgenforsøgsrækker konstateret, at 1 normal og 2 normal myresyre gav de relativt bedste kernefarvningsresultater ved en ikke alt for lang afkalkningstid. Forholdet illustreres bedst ved en sammenstillen af gennemsnitsværdier for kernefarvningsresultaterne (fotometrisk) med gennemsnitsværdier for afkalkningstiderne. Gennemsnittet er herunder udregnet for 1 normale syrer under forskellige betingelser.

Tabel XVII

Afkalkningstider og kernefarvningsresultater for 1 normale syrer under forskellige betingelser

Syreart	Afkalkningstid	Kernefarvningsresultat (fotometri)
HNO_3	6.32 timer	19.9
HCl	6.32 timer	23.3
H_2SO_3	37.20 timer	23.4
H_3PO_4	44.48 timer	15.6
H_2CrO_4	19.20 timer	49.8
HCOOH	39.44 timer	11.3
CH_3COOH	ca. 10 døgn	16.7
CCl_3COOH	20.00 timer	22.7
$C_2H_4OHCOOH$	76.52 timer	12.8
$C_6H_8O_7$, H_2O	7½ døgn	15.0

I røntgenforsøg IX undersøgtes blandt andet afkalkningstid for forskellige styrker af den rene myresyre, hvorved det viste sig, at en 4 n (ca. 20%) myresyre med en pH på 1.1 gav den hurtigste afkalkning, medens myresyre af højere normalitet viste langsommere afkalkning, særligt grelt for den koncentrerede myresyres vedkommende, idet denne afkalkede så langsomt, at vævene macereredes.

Da det yderligere ved undersøgelsesrækken over forholdet kernefarvning-pH (side 82) var godtgjort, at der var en vis sammenhæng mellem pH af afkalkningsvædsken på den ene side og afkalkningstid og kernefarvning på den anden side

på den måde, at en lav pH gav en hurtig afkalkning, men mindre god kernefarvning, medens omvendt en højere pH gav langsommere afkalkning og bedre kernefarvning, og da jeg yderligere nødigt ville arbejde med vædsker med en væsentligt lavere pH end sædvanligt for de anvendte fixationsvædsker, var det ret nærliggende at forsøge at bevare myresyrens afkalkende effekt med samtidig nedsættelse af den aktuelle brintionkoncentration.

Det var nærliggende at forsøge med en blanding af myresyre og et salt af denne syre — eventuelt afsvækket med natriumhydroxyd, hvis blandingen mod forventning skulle vise sig at være for stærk.*)

Allerede første forsøg (5. 8. 47) faldt heldigt ud. Der anvendtes her en blanding af 60 cc. 2 normal myresyre og 30 cc. 1 normal natriumformiat (altså en ren stødpudeblanding) med en pH på 2.8 (svarende til den senere myresyre-formiatblanding no. VI), som med konstant pH afkalkede i løbet af 44 timer. Dette var ikke væsentlig længere tid end for den 1 normale myresyre med en pH på 1.75, til trods for at den aktuelle brintionkoncentration er ca. 10 gange større i den rene myresyre end i myresyreformiatblanding no. VI.

Der iværksattes herefter yderligere forsøg med forskellige normaliteter af myresyre og 1 normal natriumformiat i forskellige blandingsforhold for at finde frem til en blanding med optimal afkalkende virkning og maximal pH (røntgenforsøg XIII). Af resultaterne i dette forsøg skal det fremhæves, at blanding no. I (lige dele 1 normal myresyre og 1 normal natriumformiat) med pH = 3.8 afkalkede på 5 døgn, blanding no. V (lige dele 2 n myresyre og 1 n natriumformiat) med pH = 3.25 afkalkede på $2\frac{1}{2}$ døgn, blanding no. VIII (lige dele 4 n myresyre og 1 n natriumformiat) med pH = 2.7 afkalkede på $1\frac{1}{2}$ døgn, og endelig blanding no. X (lige dele 8 n (ca. 40%) myresyre og 1 n natriumformiat) med pH = 2.2 afkalkede på knapt 1 døgn.

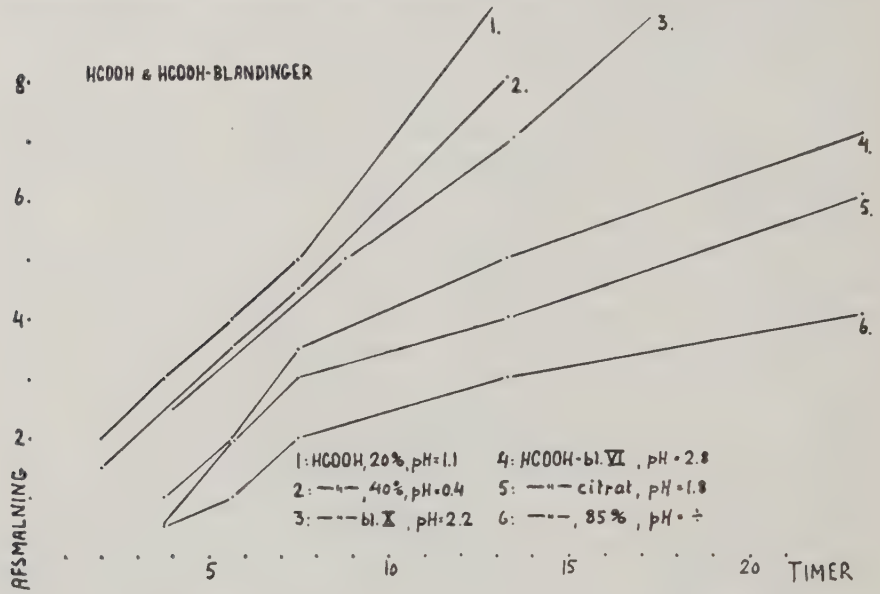
En god illustration af den afkalkende effekt af forskellige normaliteter af myresyre sammenholdt med forskellige myresyreblandinger findes i fig. 6.

Forholdet er som i tidligere diagrammer, at jo stejlere forløb kurven har, des stærkere virker vedkommende afkalkningsvædske. Det ses, at de nederste 3 kurver har principielt samme forløb, med den koncentrerede myresyre som den langsomst afkalkende. Ved sammenligning mellem myresyre-formiatblanding VI med pH = 2.8 og myresyre-citratblanding (lige dele koncentreret myresyre og 20% natriumcitrat) med pH = 1.8 (altså en brintionkoncentration 10 gange større) ses myresyreformiatblandingen dog hurtigere afkalkende. Kurverne 1, 2, og 3 som repræsenterer en passende, mellemstærk afkalkningsevne (ca. 45° med abscissen) svarer til afkalkningshastigheden for 20% myresyre (ca. 4 n) med pH = 1.1. Trods en lavere pH = 0.4 er 40% myresyre (ca. 8 n) noget langsommere end den 4 n myresyre, men mest bemærkelsesværdigt er det, at myresyre-formiatblanding no. X med pH = 2.2 (altså en væsentlig mindre brintionkoncentration end de to andre) har principielt samme forløb af kurven over afkalkningshastigheden.

Herefter er det øjensynligt, at disse myresyre-formiatblandinger er mere ideelle

*) Personlig meddelelse fra prof., dr. phil. N. Bjerrum, Den kgl. Veteriner- og Landbohøjskoles kemiske Laboratorium.

Figur 6.
Afkalkningsforløb ved myresyre af forskellige normalitet og ved myresyreblandinger.



end hidtil kendte afkalkningsvædsker, specielt i kraft af en god afkalkningsevne til trods for en ret lav brintionkoncentration. Disse egenskaber må tilskrives et ret stort brintionpotentiel hos denne stødpudeopløsning.

e. Som afslutning på dette afsnit om afkalkningstid skal nævnes den i julinummeret af Archives of Pathology (1947) publicerede afkalkningsmetode *(Richman, Gelfand & Hill)*. Det principielle i metoden er allerede anført side 77, og jeg vil kun tilføje egne erfaringer med metoden.

Af interesse for sagen havde dr. phil. *C. Munk Plum* fået fremstillet et brugbart apparat, som velvilligst blev stillet til min disposition til efterprøvning af metoden.

Apparatet var fremstillet af en glaskrukke med vid åbning, hvori passede en stor korkprop. Igennem denne prop gik to platinelektroder, der var forbundet med lysnettet (jævnstrøm) med 3 indskudte 15 watt-lamper som modstand, så strømstyrken blev ca. 6 volt. Den 16. 1. 48 kl. 1430 foretoges et forsøg med elektrolyse i Richman-apparatet, idet der som elektrolyse-vædske anvendtes myresyreformiatblanding no. X. Den positive platinelektrodes spids blev snoet omkring en knogleplade af samme art som i de øvrige forsøg, og der sattes strøm på. Der kom nu meget livlig luftudvikling ved den positive elektrode, medens der ikke skete noget særligt ved den negative elektrode. Knoglepladen fotograferedes kl. 1830, kl. 2200, den 17. 1. 48 kl. 0800 og 1200, og viste sig at være afkalket kl. 1300, altså efter ialt ca. 24 timer. Dette er samme tid, som myresyreformiat-blandingen er om at afkalke uden »elektrolyse«.

Næste forsøg iværksattes 17. 1. 48 kl. 1300. Hertil anvendtes 1) Richmans appa-

rat + vædske (lige dele 2 n HCl + 2 n HCOOH med pH = 0.1) + 1 knogleplade 2) Richmans vædske alene + 2 knogleplader. Der blev anvendt lige store mængder vædsker, og det blev iagttaget, at knoglepladerne i begge glas sad i omtrentlig samme afstand fra vædskeoverfladen, for at der ikke skulle være anledning til diffusionsforskelle. Der fotograferedes kl. 1500,1700, 1900 og 2100. Det viste sig, at der ikke var væsensforskelle på de tre knogleplader, og hvis der endelig var en forskel, faldt denne ud til fordel for afkalkningen uden »elektrolyse«.

Forfatterne, der åbenbart kun har været interesserede i en meget hurtig afkalkning og i mindre grad en skånsom afkalkning, har efter disse resultater øjensynligt ikke givet sig tid til at efterprøve, om den af dem fremstillede metode ydede noget ved afkalkningen. Specielt har de tilsyneladende ikke givet sig tid til at efterprøve, om »elektrolysen« virkelig befordrer afkalkningen.

At den angivne vædske må være ret hurtigt arbejdende er ganske naturligt, når man ved, at vædskens pH er 0.1, altså lige så stærk som 1 normal saltsyre eller salpetersyre.

Hertil kommer yderligere, at der anvendtes rigelige mængder vædske, og der anbefaledes, at temperaturen af badet skulle ligge mellem 30°–45°!

Da det er påfaldende, at der kun kommer den ønskede effekt, når man som elektrolyt anvender højt ioniserede syrer, der danner vandopløselige salte med Ca, og at lavt ioniserede syrer ikke har den ønskede virkning som elektrolysebad i henseende til den tænkte fremskyndede vandring af Ca^{++}-ioner mod den negative elektrode, er det sandsynligt, at *den anvendte vædske og dennes temperatur alene er årsagen til hurtig afkalkning*. Dette stemmer med de foretagne kontrolforsøg, som ikke viser antydning af virkning af den såkaldte »elektrolyse«.

3. *Farveresultater efter afkalkning.*

Der findes kun et ringe antal arbejder, hvor man har indtrykket af, at forfatterne selv har foretaget systematiske undersøgelser for at blive klar over forskellige syrers beskadigende egenskaber overfor vævsfarvningerne. Langt de fleste arbejder, og specielt de større håndbøger, bygger på citater fra andre arbejder. I nogle arbejder har man endda indtrykket af, at man tildels bliver præsenteret for mundtlige overleveringer (f. eks. *Haugs* arbejde). I virkeligheden findes der kun tre arbejder af værdi for spørgsmålet: *Zieglers* (1899), *Murayama & al.'s* (1937) samt *Lillies* (1944). Der er i alle tilfælde anvendt regressive farvemetoder (*Ziegler* og *Murayama & al.*: Hæmatoxylin, *Lillie*: Romanowskyfarvning), medens ingen har tænkt på anvendelsen af *Einarsons* gallocyanin (publiceret 1932). Fordelene ved denne kernefarvningsmetode (som farver Nissl-substans elektivt) er umiddelbart indlysende, når man ved, at gallocyaninkromalunlakken farver progressivt. Ved anvendelse af denne metode risikerer man altså ikke som ved de regressive (hvor differentiering er nødvendig) at indføre fejlkilder som følge af subjektivitet under differentieringen, også udtrykt i *Lagerstedts* arbejde (1947): »Gallocyanine staining as a specific method for production of protein inclusions in liver cells«. Og selv om man ikke differentierer efter farvning med de regressive metoder, således som det er forsøgt det ved mine første farveundersøgelser, har man ingen garanti for, at vævsfarvningen er den samme fra gang til gang. I modsætning hertil besidder gallocyanin den egenskab ikke at overfarve, så kerner i

samme funktionelle stade og fra samme art celler viser en ensartet farvbarhed. Forholdet bekræftes på bedste måde af mine kontrolfotometerundersøgelser, som skal omtales senere i dette afsnit.

Med andre ord er gallocyaninfarvningen den eneste farvemetode, som med sikkerhed tillader os at udtale os om farveresultaterne efter syrepåvirkning, og hvad der ikke er mindre vigtigt — tillader os en exact bedømmelse af afkalkningens indflydelse på Nissl-farvningen.

Ziegler har anført følgende om farveresultater efter afkalkning (farvningen ser ud til at være hæmalun — det undersøgte væv er knoglevæv): Kromsyre og dens salte giver slet farvbarhed og tager lang tid. Ved anvendelse af v. Ebners saltsyre-kogsaltblanding kommer der dårlig farvbarhed og samtidigt var præparaterne vanskelige at skære. Salpetersyre i vandig opløsning (3–9%) afkalker ret hurtigt, bevarer celle- og kernestrukturer ret godt, idet der dog er nogen skrumpning. Farvbarheden er helt god. *Thomas* salpetersyrealkohol har *Ziegler* fundet giver ret hurtig afkalkning, men vævet bliver skørt, cellerne skrumper, og der kommer slet farvbarhed. Floroglucin-salpetersyre (efter *Haug* og *Andeer*) afkalkede ret hurtigt, men præparaterne blev meget hårde, og man kunne ikke få distinkt farvning med noget som helst reagens. Mælkesyre (5 og 10% opløsning) afkalker på forholdsvis kort tid, farvningen er god, og der er ikke særlig skrumpning. Fosforsyre i de samme styrker som foregående afkalker på tilsvarende tid og udviser let skærbare præparater med en særdeles god farvbarhed, hvorfor forfatteren anbefaler metoden. Citronsyren afkalker på samme måde som fosforsyren. Cellerne er måske lidt skrumpede, men farvningen er god. Eddikesyre i 10% opløsning i mættet kogsalt afkalker på 8 dage, cellerne er godt holdt, farves godt, men er noget skrumpede og tilfredsstiller ikke som fosforsyren. Svovlsyrling overgår alle de nævnte metoder og var på daværende tidspunkt ikke blevet omtalt i litteraturen. Den afkalkede i løbet af meget kort tid, og efter 24 timers udvaskning i vand var farvning med alle farver fortræffelig. Hvis ophold i syren var nødvendig ud over 8 dage, blev strukturen af cellerne dog noget udflydende. Svovlsyrlingens overraskende store afkalkningsevne mente *Ziegler* kunne forklares ved, at det uopløselige trikalciumfosfat med svovlsyrling skulle danne det letopløselige monocalciumfosfat. Dette må siges at være en søgt forklaring, idet der er større sandsynlighed for, at der dannes fosforsyrer samt normale eller sure salte af svovlsyrlingen med kalcium. Og hvad angår opløseligheden i vand, så er den ikke så lidt større for sulfiterne og hydrosulfiterne end for monocalciumfosfat, et forhold som dog ikke spiller så stor rolle, da opløselighedsproduktet ikke nås i denne sure opløsning hverken for sulfiternes eller monosulfatets vedkommende.

Murayama, Suzuki & Itoh undersøgte afkalkningstiderne ved forskellige temperaturer og i relation hertil farvbarheden af vævene (knoglevæv) med hæmatoxylin. Det viste sig, at farvbarheden både ved knogle- og tandvæv var bedst for trikloreddikesyrens og myresyrens vedkommende, medens salpetersyre og sulfosalicylsyre gav de sletteste resultater. Da forfatterne antog, at salpetersyre og trikloreddikesyre som de hurtigst afkalkende havde den største praktiske betydning, foretoges desuden eksperimenter over temperaturens indflydelse på farv-

barheden ved anvendelse af disse to syrer. Resultatet blev, at 10% trikloreddikesyre var den af de sædvanligt brugte afkalkningsvædsker, som viste den mindste beskadigelse af farvbarheden og den hurtigste afkalkningshastighed. 25% myresyre besad en god farvbarhed ved en kort afkalkningstid, især var den fortræffelig ved hårde væv, medens en noget længere afkalkning udviste en tydelig beskadigelse af farvbarheden. Selv om salpetersyre ligesom sulfosalicylsyre viste en påfaldende nedsættelse af farvbarheden, bør den på grund af sin billige pris i forhold til andre syrearter anvendes til daglig brug.

Princippet i *Lillies* undersøgelser over knoglemarvens farvning med Romanowsky-farvningen er tidligere omtalt. Resultatet af disse undersøgelser var, at myresyrecitratblandinger med pH over 3.0 tillod god Romanowsky-farvning, men afkalkede langsomt, puffet myresyre med pH på omkring 2.5 afkalkede hurtigere, men viste en tendens til at kompromittere marvfarvningen, således at den 5% myresyreopløsning i almindelighed var bedre. Trikloreddikesyren fandtes at være god, men der skulle bruges mere af den (større molekylvægt), og den var dyrere i anvendelse end myresyren (også pointeret af *Juul & Vraa-Jensen*).

De stærkere syrer, salpetersyre og svovlsyrling, afkalkede prompte, men salpetersyren ødelagde marvfarvningen lige så prompte, og svovlsyrlingen tenderede hertil, hvis afkalkningen tog 2 dage eller mere.

Alkoholiske blandinger afkalkede ikke, og anvendelse af vakuum var ingen fordel.

Ved det første modelforsøg (I) anvendtes farvning efter regressive metoder *(Bøhmers* og *Weigerts* hæmatoxylin samt Azur-eosin efter *Romeis)*, men allerede i de følgende modelforsøg (II, III, IV og V) anvendtes regressive metoder jævnsides med gallocyaninfarvningen, og i de sidste modelforsøg (røntgenforsøg I–XV) anvendtes udelukkende gallocyaninfarvning som kontrol for vævenes farvbarhed efter syrepåvirkning.

a. *Ribbensmodelforsøg.* Undersøgelsen af farveresultaterne i disse forsøg såvel efter progressiv som regressiv farvning foretoges i sammenligningsmikroskop på den måde, at hvert eneste præparat i de enkelte undersøgelsesgrupper sammenlignedes med ikke syrepåvirkede kontrolpræparater og sammenlignedes indbyrdes, før der foretoges notering af resultaterne. Først ved den derpå følgende gennemgang af hvert enkelt præparat foretoges en samtidig beskrivelse af præparatets mikroskopiske egenskaber, især i henseende til farveintensiteter. De fortløbende mikroskopier findes samlede i forsøgsprotokollen, således at kun hovedtræk skal omtales her.

α) *Regressive farvemetoder.* Ved farvning af postmortelt fixerede marsvineorganer (hjerne, lever og nyrer) med *Bøhmers* hæmatoxylin og *Weigerts* hæmatoxylin samt ved farvningen af knoglestykkerne (ligeledes postmortelt fixerede) med Azur-eosin fandtes syrernes fordeling efter nedsættelsen af farvbarheden at være følgende (idet de mindst beskadigende nævnes først): 10% mælkesyre, 10% citronsyre, 10% trikloreddikesyre (nærmede sig kontrolpræparatet), 5% svovlsyrling, 5% salpetersyre, 5% saltsyre og som de sidste mest farvebeskadigende: kromsyre og 5% svovlsyre.

Det var påfaldende, at farvningerne efter udsættelse for mælke- og citronsyre var kraftigere end i kontrolpræparatet. Dette forhold findes også ved myresyre i næsten alle efterfølgende farveforsøg.

Svovlsyre- og kromsyre-præparaterne var de slettest tænkelige, idet vævene makroskopisk var blegt røde, og mikroskopisk praktisk talt uden celle- eller kernetegning.

I de følgende modelforsøg II, III, IV og V er der udelukkende anvendt intravital fixation med Susa, Kaformacet eller Carnoy-blandinger. Herefter blev i nogle undersøgelser hjerne, lever og nyre fjernede til kontrol af farvningen efter afkalkning, medens i andre undersøgelser lever, nyre og rygmarv blev fjernede. Grunden til, at der i de senere forsøg (IV og V) skiftedes over til anvendelse af rygmarv i stedet for hjernevæv, var, at det ikke altid var let at finde ganglieceller i hjernesnittene, medens man i rygmarv altid vidste, hvor man skulle lede efter de motoriske forhornsceller. Det var vanskeligere at få medulla spinalis ud i forhold til fjernelse af hjernen, men det lykkedes altid godt, uden at vævet lacereredes, og specielt var fixationen hver gang upåklagelig.

Der er farvet med *Bøhmers*, *Carazzis* og *Haidenhain-Regauds* hæmatoxyliner. *Resultaterne i modelforsøg II og III* er anført i samme gruppe.

Ved farvningen med *Bøhmers* hæmatoxylin kunne man opstille syrerne i en bestemt rækkefølge i lighed med modelforsøg I på grundlag af syrernes beskadigende indflydelse på farvbarheden: Kromsyre, floroglucinsalpetersyre, salpetersyre-formol, svovlsyre, saltsyre-natriumklorid, saltsyre, salpetersyre, salpetersyre-citrat, (kontrolpræparaterne), trikloreddikesyre (efterbehandlet med natriumsulfat, 5%), svovlsyrling, citronsyre, mælke- og myresyre og myresyre-citrat. I talrige af præparaterne er der omtalt udfældninger, der senere er klarlagt at være et produkt af for megen gelatine i gelatinevandet, der anvendtes til at fixere snittene på objektglassene. Ved anvendelse af mindre gelatine kom der ikke sådanne udfældninger. Ligesom i forrige forsøg konstateres her varierende tegning af kromatinet fra det allerdårligst tænkelige (kromsyre og floroglucin-salpetersyre) til en kromatinfarvning, som langt overgår forholdene i kontrolpræparaterne (myre-, mælke- og citronsyre). Den dårligere farvning efter behandling med trikloreddikesyre efterbehandlet med natriumsulfat i forhold til præparaterne fra samme syre, men uden efterbehandling med natriumsulfat henledte opmærksomheden på eventuel indflydelse af natriumsulfat på farvningen. Farvningen i denne undersøgelsesrække var ikke så god som ønskelig.

Ved farvning med *Haidenhain-Regauds* hæmatoxylin foretoges et indledende forsøg på kontrolpræparaterne for at se, om præparaternes kromering skulle have nogen indflydelse på præparaternes farvbarhed, og det viste sig da, at de afkromerede præparater (a. m. *Tsiminaki*) var betydeligt klarere og skarpere i tegningen end de ikke afkromerede (de almindelige) kontrolpræparater. Farverne stod mere distinkt sortblå på næsten ufarvet baggrund, medens kontrolpræparater var mere grålige i kernerne, der i nogen grad gled i eet med baggrunden. Ved den påfølgende undersøgelse i sammenligningsmikroskop er sammenligningen foretaget både med kontrolpræparat og afkromeret kontrolpræparat som grundlag for at få et mere fuldgyldigt udtryk for syrepåvirkningen.

Syrernes rækkefølge i henseende til beskadigelse af farvningerne er næsten den

samme som i de *Bøhmer*-farvede præparater, men iøvrigt er farvningen som helhed forbavsende god, også gældende for de stærkest virkende syrer. Farvningen kan dog ikke dække den store ødelæggelse af strukturerne, som har fundet sted efter behandling med kromsyre og floroglucin-salpetersyre.

Regaud-Haidenhain hæmatoxylin er med andre ord en god farvevædske, hvis man vil have strukturer frem i så stor udstrækning som muligt til trods for en hårdhændet syrebehandling. På den anden side er denne farvemetode ingen god indikator for eventuel syrepåvirkning, omend der ses forskelle beroende på behandlingen af vævet og på vævsarten (nyre, lever eller hjerne), men også forskelle, som kun kan være udtryk for forskelle i farvevædskens farvekraft, idet ensartet behandlede væv kan udvise forskelle i farvetoner. Iøvrigt har dette forsøg tydeligt vist, at man for at bedømme Nissl-substansens påvirkelighed af syrebehandlingen, bør anvende organer, hvor man med sikkerhed ved, at der findes Nissl-substans (f. eks. rygmarven fra marsvinene), idet det i denne forsøgsrække flere gange har voldt vanskelighed at finde ganglieceller i hjernesnittene. Dette var mest påfaldende i præparater, hvor man skulle vente at finde dem trods behandlingen. Snitføringen er åbenbart faldet så uheldigt, at der ikke er kommet ganglieceller med.

Ved farvning med *Carazzis* hæmatoxylin er der ligesom i de forrige grupper fundet en noget svingende farvning fra syre til syre og fra den ene til den anden vævsart indenfor samme syregruppe. Rækkefølgen af syrerne opstillet efter de hidtil anvendte principper er følgende: Kromsyre og floroglucinsalpetersyre — trikloreddikesyreformol og salpetersyrealkohol – svovlsyre og salpetersyreformol – saltsyrenatriumklorid — (kontrolpræparaterne) og myresyrealkohol — saltsyre og salpetersyre — trikloreddikesyre — myresyrecitrat, salpetersyrecitrat og svovlsyrling — myresyre — mælkesyre — citronsyre. Også ved denne farvning er der lavet undersøgelser over farvningen af kontrolvævssnit og af vævssnit, der var blevet afkromerede a. m. *Tsiminaki*. Denne afkromering foretoges på kontrolpræparaterne, på præparaterne behandlede med kromsyre, saltsyrenatriumklorid og salpetersyrecitrat. Det viste sig herved, at det afkromerede kontrolpræparat var betydeligt bedre i farvemæssig henseende end det ikke afkromerede kontrolpræparat. De afkromerede, kromsyrebehandlede præparater var bedre end de ikke afkromerede præparater, men kom dog ikke på højde med nogen af de bedre grupper — mindede mest om salpetersyreformol-præparatet. Salpetersyrecitratpræparaterne var efter afkromering nærmest overfarvede. Ved saltsyrenatriumkloridpræparaterne hjalp afkromering ikke på farvbarheden.

Indenfor modelforsøg IV er farvning med *Carazzis* hæmatoxylin samt *Haidenhain-Regauds* hæmatoxylin på lever-, nyre og rygmarvsvæv undersøgt efter fixation med *Susas* vædske. Samtidigt er der foretaget en sammenlignende undersøgelse over syrepåvirkningen indenfor de to kategorier af fixation, der indtil nu har været anvendt (susa- og kaformacetfixation), for at komme til klarhed over, hvilken af disse fixationsvædsker, der bedst hindrede syrernes skadelige indflydelse på vævsfarvningen.

Som tidligere nævnt under fixation viste et susa-fixeret kontrolpræparat farvet samtidigt med et kaformacet-fixeret kontrolpræparat bedre farvning. Forholdene

fandtes noget svingende indenfor lever- og nyrepræparaterne, men bedst for de kaformacet-fixerede præparater efter de svagere syrer. I de stærkere syrer fandtes ingen større forskel.

Ved undersøgelse af Nissl-farvningen a. m. *Carazzi* viste Kaformacet-fixationen sig gennemgående overlegen i forhold til Susa-fixationen.

Iøvrigt viste syrerne farvebeskadigende egenskaber i følgende orden: Svovlsyre, kromsalpetersyre, saltsyre, salpetersyreformol, salpetersyre (kontrolpræparater), salpetersyrecitrat, trikloreddikesyre, mælke-, myre- og citronsyre.

Haidenhain-Regaud-farvning viste stort set den samme rækkefølge for syrernes farvebeskadigende virkning, og desuden fandtes ligesom ved modelforsøgene II og III, at bortset fra kromsyre- og kromsalpetersyre samt svovlsyre var farvningerne i alle de øvrige syregrupper tilfredsstillende. Der var forskelle, som ikke kunne tilskrives syrebehandlingen alene. Efter farvningerne er det evident, at differentiering spiller en meget stor rolle for det endelige farveresultat. Denne farvemetode giver i egnede tilfælde en smuk børstesøm og veludtalte mitochondrier i nyrens tubuli. Børstesømmens udseende kan til en vis grad anvendes som rettesnor for syrernes vævsødelæggende virkning. De organiske syrer gav de smukkeste billeder, særligt citronsyre, hvorefter desuden lumina i kanalerne var meget regelmæssige.

I modelforsøg V er undersøgt farvning af carnoy-fixeret lever, nyre og rygmarv med *Haidenhain-Regauds* og *Carazzis* hæmatoxyliner.

Haidenhain-Regaud-farvning: Viste samtlige præparater, selv svovlsyrepræparater, der plejer at være meget svage i tonen, stærkt sværtede. Dette gjaldt især nyrevævene, der frembød et højst ejendommeligt billede, idet der fandtes en uniform sværtning af protoplasma, kerner og mitochondrier i tubuli contorti, medens børstesømmen var så godt som ufarvet. De glomerulære elementer, samlerør, nedadstigende slynger og samtlige rør i marven besad væsentlig mindre protoplasmatisk sværtning. Kernerne var overalt (bortset fra de mørke partier, hvor de var maskerede) meget smukke og kraftigt tegnede. Den udtalte sværtning af kromatoidet som sammenhængende flager og uden tegn på uddifferentieren i stave skyldes formentlig den meget hurtige fixation. I det hele taget er der i samtlige præparater fundet allerhøjeste grad af fixation, hvad der blandt andet har givet sig udtryk i, at disse præparater reagerer mindst på syrepåvirkning. I dette tilfælde kan farvningen ikke anvendes til at studere syrens indflydelse på farvbarheden. En meget stor ulempe ved fixationsmetoden er, at der i så godt som alle præparater enten slet ikke er Nissl-substans, eller højst dårligt udtalt Nissl-substans.

Ved *Carazzi*-farvningen fandtes ligeledes meget smuk kernetegning og kraftig fixation. Kun i svovlsyrepræparatet var kernetegningen stærkt svækket, så billedet var helt udflydende. Der var i det hele taget ikke nogen stor spredning i den skadelige indflydelse af syrerne på farvbarheden, åbenbart som følge af den meget stærke fixation. Imidlertid er metoden behæftet med en alvorlig ulempe: Ligesom ved *Haidenhain-Regaud*-farvningen er der fundet destruktion af Nissl-legemerne (eller disses farvbarhed). Det er nærliggende at tænke, at dette kan være forårsaget af 1) indholdet af kloroform, 2) det store indhold af iseddike, nemlig ialt 33% (sml. *Hopkins*). Fixationsmetoden er i alle tilfælde efter dette uanvendelig til undersøgelser, hvor der i væsentlig grad skal tages hensyn til Nissl-substansen.

β) *Progressiv farvning med Einarsons gallocyanin.*

Modelforsøg II–III. Der er i forsøgene anvendt farvning af hjerne, lever og nyre med gallocyaninkromalunlak.

Allerede ved makroskopisk sammenligning mellem præparaternes farvetone på hvid baggrund kunne man opstille den rækkefølge, i hvilken syrerne beskadigede vævsfarvningen (en rækkefølge som stort set stemte med den rækkefølge, som opstilledes ved mikroskoperingen). De stærkest blå præparater regnedes til de mindst beskadigede. Rækkefølgen var: Floroglucinsalpetersyre, svovlsyre, salpetersyrealkohol, kromsalpetersyre, trikloreddikesyrealkohol, kromsyre, saltsyre, salpetersyreformalin, salpetersyrecitrat, myresyrecitrat, trikloreddikesyre, svovlsyrling, myresyre, mælkesyre og citronsyre. Saltsyrenatriumklorid svarede nærmest til kromsalpetersyre, myresyrealkohol havde praktisk talt samme farvetone som trikloreddikesyrealkohol, og saltsyre og salpetersyre var nogenlunde ens.

Også ved den progressive farvning ses, at de svage syrer, og i særdeleshed de organiske syrer (med undtagelse af trikloreddikesyre) er de mest skånsomt arbejdende, hvad angår kernefarvningerne. Sidstnævnte forhold gør sig i særlig grad gældende, når det drejer sig om Nissl-substansen, idet der kun findes Nissl-substans i præparaterne, der har været i ren trikloreddikesyre, myresyre, citron- og mælkesyre.

Ved sammenligning mellem kontrolpræparaterne og præparater, der var afkromerede efter *Tsiminakis* metode, fandtes ingen fordel af anvendelsen af afkromering, idet kontrolpræparaterne såvel makroskopisk som mikroskopisk var væsentligt kraftigere farvede. Denne forskel i farvbarhed ligger antagelig i, at den farvende substans indeholder kromalun. Det ser ud, som om det ikke kan betale sig at fjerne kromen, når der alligevel skal fæstnes nyt på senere. Muligvis får gallocyaninkromalunlakken endda vanskeligere ved at fæstne sig, efter at en afkromering har fundet sted?

Modelforsøg IV (undersøgelse af rygmarv, væsentligst Nissl-farvningen) viser, at der i den absolutte farvning ikke er større forskel på, om præparaterne er fixerede i Susa eller Kaformacet, men medens Susa-præparaterne altid viser nogen medfarvning af det omgivende cytoplasma, er tegningen i Kaformacet-præparaterne skarp og tydelig. Nissl-substansen forefindes i de præparater, der har været i svage, organiske syrer, og hvad der er værd at lægge mærke til, i stærke syrer med tilblanding af salte, selv om tegningen i sidstnævnte ikke er særlig god. Af de organiske syrer er myresyren i denne undersøgelsesrække så afgjort den bedste, specielt fordi Nissl-tegningen i præparaterne, der har været i citron- og mælkesyre er mindre skarp.

Ved undersøgelse af lever og nyrer, der er susa-fixerede, ses at de præparater, der har været udsat for svovlsyre, saltsyre og kromsalpetersyre bliver yderst slette i farvningen. Salpetersyreformalin og salpetersyre er kun lidt bedre, ligesom trikloreddikesyren ikke formår at hæve sig meget over farveresultatet efter salpetersyrepåvirkningen. Svovlsyrling og salpetersyrecitrat er en del bedre end de foregående, men ikke gode sammenlignet med kontrolpræparaterne. For myresyrens, citronsyrens og mælkesyrens vedkommende fås resultater, der absolut står

på højde med kontrolpræparaternes udseende. Det bedste resultat fås med myresyre, både ved farvning af lever- og nyrevæv.

Modelforsøg V (fixation med *Carnoy-Lebrun*) viser det sædvanlige forhold i anvendeligheden af stærke syrer overfor svage syrer med myresyren som den bedste, og på højde med kontrolpræparaterne. Imidlertid ses i de præparater, hvor Nissl-substansen i det hele taget findes, et påfaldende misforhold mellem den skarpe og udtalte kernetegning og den meget slette tegning af Nissl-substansen. Det samme forhold gør sig gældende i kontrolpræparatet, hvor der højst ses antydning af korn og ellers kun en blåsort, udflydende masse, der slører kernens grænser noget. Det vil med andre ord sige, at *Carnoys* vædske (lige dele absolut alkohol, kloroform og iseddike) er et uhyre godt fixativ, når det gælder kernerne, men uanvendeligt, når det gælder Nissl-substansens bevarelse.

b. *Knoglepladeforsøg.*

α) *Sammenligningsmikroskopi af formolfixeret rygmarv.* Der er til denne undersøgelse anvendt frisk formolfixeret kalverygmarv, der er behandlet som almindeligt histologisk præparat og skåret i snit (i paraffin) med påfølgende montering af snittene på objektglas. Efter afparaffinering er præparaterne ført til vand og herfra til de forskellige syrer, hvor de har været udsat for syrepåvirkningen så lang tid, som det var nødvendigt for de små knogleplader at decalcifiere helt. Herefter skylledes præparaterne i rindende vand i 24 timer, afskylledes i destilleret vand og farvedes i gallocyanin i 24 timer.

De anvendte syrer var: Salpetersyre, saltsyre, svovlsyrling, fosforsyre, kromsyre, myresyre, eddikesyre, trikloreddikesyre, mælkesyre og citronsyre, der anvendtes i 1 normale, 2 normale og 1/10 normale opløsninger. Endvidere undersøgtes med 1 og 2 normale brugte syreopløsninger samt 1 normale opløsninger ved 33° og 4° C. Desuden undersøgtes med forskellige koncentrationer af myresyre, forskellige myresyre- og salpetersyreblandinger og myresyreblandingerne I–X. Endelig undersøgtes forholdene ved syrepåvirkning i det dobbelte af den for afkalkningen nødvendige tid (overafkalkning) for 1 og 2 normale syrer samt for myresyreblandingerne V–X.

Samtlige præparater sammenlignedes dels indenfor de enkelte forsøgsrækker, dels indenfor de forskellige forsøgsrækker, for at få et fuldstændigt overblik over, hvilken syre eller syreblanding, der gav optimale farveresultater.

2 normale syrer ved stuetemperatur viste nedsat farvbarhed samt manglende Nissl-substans for kromsyrens, trikloreddikesyrens, saltsyrens og salpetersyrens vedkommende i forhold til farvningen efter udsættelsen for de tilsvarende 1 normale syrer. For myresyrens, eddikesyrens og mælkesyrens vedkommende fandtes en større intensitet af præparaterne, der havde været i 2 normale syrer i forhold til præparater, der havde været i 1 normale syrer. De bedste præparater var således 2 normal myresyre, eddikesyre og mælkesyre.

1 normale syrer ved stuetemperatur viste slet farvbarhed og manglende Nissl-substans for kromsyrens vedkommende. Lidt bedre var forholdene for salpetersyre og saltsyre, hvor især gliacellekerner og ependymcellekerner var helt pæne,

medens Nissl-substansen kun var antydet. Trikloreddikesyren svarede til de to sidstnævnte. For de øvrige syrers vedkommende fandtes ensartet farvning af kerneplet, gliacellekerner, ependymcellekerner og Nissl-substans.

Ved sammenligning mellem grupperne af *1 normal syrer ved forskellig temperatur* fandtes, at den højere temperatur var ødelæggende for såvel kernefarvning som for Nissl-farvningen, medens den lavere temperatur viste en vis bevarende evne overfor farvning af kerner og Nissl-substans. Således fandtes Nissl-substansen i saltsyrepræparatet og i salpetersyre-præparatet ganske pæn. Denne beskyttende effekt var efter præparaterne at dømme ens for de forskellige syrearter, således at der intet er at vinde ved at anvende een bestemt syre i nedkølet stand.

Ved sammenligning af præparater, der havde været i 4° syrer, med præparater fra myresyreformiatblandingerne 1–10 ved stuetemperatur fandtes, at ingen af de førstnævnte præparater kom på højde med myresyreformiatpræparaterne, der var af en væsentlig dybere blå tone med mere distinkt farvning af Nissl-substansen, ligesom gliacellekernerne utvivlsomt var noget mørkere i tonen.

Forklaring til figurtavle VII

Gallocyaninfarvede ganglieceller efter afkalkning

1: Salpetersyre, 1 normal, 33° C.
2: — , 1 normal, stuetemperatur.
3: — , 1 normal, overafkalkning, stuetemperatur
4: — , 1 normal, 4° C.
5: — , 1 normal, brugt, stuetemperatur.
6: — , 1/10 normal, stuetemperatur.

7: Myresyre, 2 normal, stuetemperatur.
8: — , 1 normal, stuetemperatur.
9: — , 1 normal, overafkalkning, stuetemperatur.
10: — , 2 normal, overafkalkning, stuetemperatur.
11: — , 1 normal, brugt, stuetemperatur

12: Kontrolpræparat.

13: Myresyreblanding X, stuetemperatur.
14: — VIII, stuetemperatur.
15: — VIII, overafkalkning, stuetemperatur.
16: — I, stuetemperatur.

17: Myresyre-citratblanding, stuetemperatur.

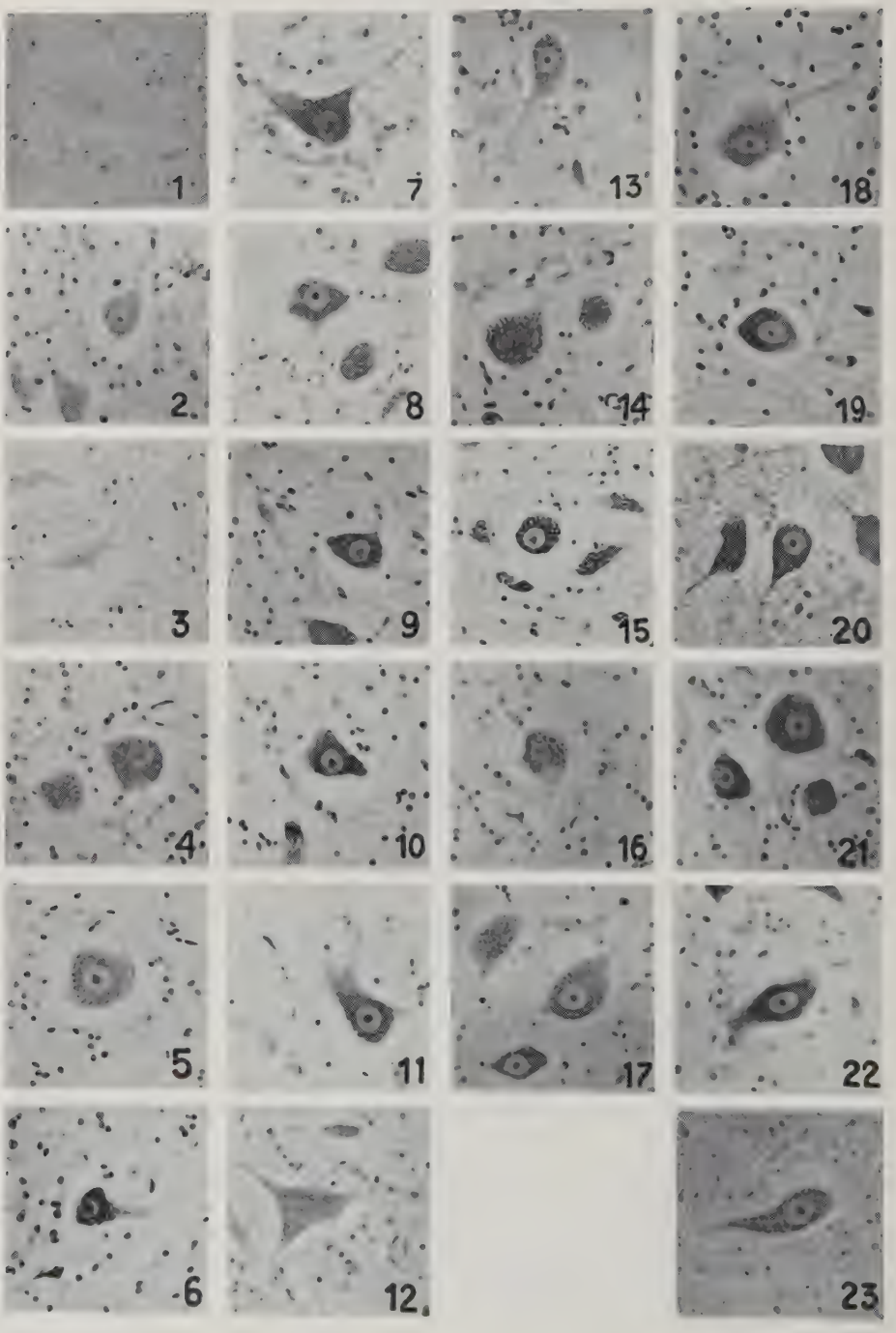
18: Eddikesyre, 3 normal, stuetemperatur.
19: Lanthanacetat-eddikesyreblanding, stuetemperatur.

20: Citronsyre, 1 normal, 33° C.
21: — , 1 normal, 4° C.

22: Svovlsyrling, 1 normal, 4° C.
23: — , 1 normal, 33° C.

Figurtavle VII

Gallocyaninfarvede ganglieceller efter afkalkning
(Forstørring 225 gange)



Ved sammenligning med kontrolpræparatet fandtes, at kromsyre-, salpetersyre- og trikloreddikesyrepræparaterne var dårligere end kontrolpræparatet. De øvrige syrepræparater viste en mere distinkt og stærkere farvning af Nissl-substansen, idet baggrunden for disse var mindre farvet end i kontrolpræparatet. Den bedre farvning var ret udtalt for myresyrens, eddikesyrens og mælkesyrens vedkommende.

1/10 normale syrer ved stuetemperatur viste sammenlignet med tilsvarende præparater indenfor 1 normal syre-behandlede præparater en bedre farvning for samtlige præparater, mest udtalt for de totalt dissocierede syrers vedkommende, mindre for de middelstærke syrer og næsten ikke for de organiske syrers vedkommende. Rækkefølgen i henseende til farvbarhed var den sædvanlige. Præparaterne var lidt bedre i forhold til præparater, der havde været i kølede syrer.

2 normale, brugte syrer viste stor overensstemmelse med præparaterne, der havde været udsat for 2 normale syrer, overafkalkning, mindre med ubrugte, 2 normale syre-præparater. Præparaterne fra saltsyre, salpetersyre, kromsyre og trikloreddikesyre var aldeles ufarvede. Resten af præparaterne var også dårligt farvede. Efter dette er det ikke fordelagtigt at anvende brugte syreopløsninger, selv om man på forhånd ville tillægge disse en vis beskyttende virkning overfor vævene.

1 normale, brugte syrer viste for kromsyre, saltsyre og salpetersyre slet farvbarhed og kun antydning af dårligt farvet Nissl-substans. Lidt bedre forhold for trikloreddikesyrens vedkommende.

Der fandtes ingen overbevisende forskelle på præparaterne fra denne gruppe og præparaterne fra de 1 normale syrer med undtagelse af myresyre-, eddikesyre-, mælkesyre- og citronsyrepræparaterne, hvor farvningen var mere intens i de præparater, der havde været i brugte syreopløsninger. Særligt var Nissl-tegningen mere intens.

Ved undersøgelse af forholdene for *myresyre i forskellige koncentrationer* og forskellige myresyre- og salpetersyreblandinger fandtes 10, 20 og 40% myresyre at give god farvning af samtlige elementer, medens den koncentrerede myresyre kun viste middelmådig farvning med pletvis tilløb til Nissl-farvning. Myresyreformiat viste en farvning af næsten samme kvalitet som 10, 20 og 40% myresyre, men noget mere distinkt end disse. Myresyrecitrat viste forhold svarende til, hvad man fandt ved koncentreret myresyre. De alkoholiske opløsninger af myresyre og salpetersyre viste dårlige farveresultater, og det samme gjaldt salpetersyreformol, mens salpetersyrefloroglucin mod forventning viste en noget bedre Nissl-tegning end salpetersyren (1 normal).

Myresyreblandingerne 1–10 viste i samtlige tilfælde udmærkede farvninger af samtlige elementer. Præparaterne stod fuldt på højde med kontrolpræparaterne i farveteknisk henseende, endog med bedre kontrast end i disse. Ved sammenligning med myresyreformiatblanding (overafkalket) 5–10 fandtes forholdene fuldstændigt identiske med de ikke overafkalkede myresyreformiatblandinger.

1 normale syrer, overafkalkning, viste slet farvning af saltsyre-, salpetersyre- og kromsyrepræparater, medens trikloreddikesyrepræparatet afveg ved en lige antydet Nissl-substans. Fosforsyre- og svovlsyrlingpræparaterne var kun lidt bedre end de foregående, medens myresyre-, eddikesyre-, mælkesyre- og citronsyrepræparaterne var over middel farvede. Ved sammenligning med *1 normale syre-*

præparater var samtlige præparater i denne gruppe mindre intenst farvede. Forskellen var mest udtalt for de totalt dissocierede syrers vedkommende, mindre udtalt, men tydelig for de middelstærke syrer og forholdsvis ringe for de svage, organiske syrers vedkommende.

2 normale syrer (overafkalkede) viste, at kun myresyrepræparatet kunne stå for kritik. Sammenlignet med de ikke overafkalkede, 2 normale, syrepræparater fandtes kraftig formindsken af farvbarheden efter alle syrer, medens myresyren ene af dem alle hævdede sig ved at være lige så god som i det ikke overafkalkede præparat.

Dette vil sige, at vævene kan tåle at stå i syre ud over den for afkalkningen nødvendige tid, når det drejer sig om myresyre eller bedre myresyreformiatblandingerne. Dette kan ved afkalkning i praksis kun være en betydelig fordel.

Da *Hamberger & Hyden* i et arbejde fra 1945 (»Cytochemical changes in the cochlear ganglion«. . . .) havde angivet, at $La(OCOCH_3)_3$ var i stand til at udfælde nukleinsyrekomponenterne i cellen (altså også Nissl-substansen) under den påfølgende afkalkning, foretoges også en undersøgelse over Lanthanets eventuelle beskyttende effekt overfor Nissl-farvning efter afkalkning. Der anvendtes 3 n eddikesyre og 3 n eddikesyre, der var 0.05 molær med hensyn til lanthanacetat samt 3 n salpetersyre og 3 n salpetersyre, der var 0.05 molær med hensyn til lanthannitrat. Ved undersøgelsen registreredes afkalkningstid og kernefarvning (fotometrisk) i forbindelse med Nissl-farvningen i rygmarv fra marsvin.

Efter 3 n salpetersyre var der ikke antydning af Nissl-substans, og det samme var tilfældet med salpetersyre-lanthannitrat. 3 n eddikesyrepræparatet viste veludtalt Nissl-substans med tendens til sammenflyden. Samme forhold fandtes i lanthanacetat-eddikesyrepræparatet. De to sidste opløsninger viste ingen væsensforskelle i forhold til myresyreformiatblanding no. 10, overafkalket. Afkalkningstiderne (røntgenforsøgstavle XIV) var følgende: 3 n eddikesyre var >7 døgn om at afkalke, myresyreformiatblandingen afkalkede på ca. 1 døgn, medens lanthanacetat-eddikesyreblandingen efter over 1 måned ikke viste antydning af afkalkning på røntgenpladen.

Resultatet af denne undersøgelse over Nissl-farvningen med gallocyanin efter afkalkning bliver herefter, at der er en udstrakt overensstemmelse mellem denne Nissl-farvning og pH af den anvendte afkalkningsvædske (vist i tavlen på side 82). Jo højere brintionkoncentration, den anvendte vædske har, des mindre chance er der for at få Nisslstrukturen frem med gallocyanin. Jo lavere brintionkoncentration, der anvendes i afkalkningsvædsken, des større chance er der for at få et godt Nissl-billede frem. Dette stemmer også på bedste måde med resultatet af *Einarsons* undersøgelser (1935) over Nissl-billedets afhængighed af fixationsvædskens surhed, og stærke syrers indflydelse på Nissl-billedet. *Einarson* anførte, at fixation med rene syrer praktisk talt ikke gav nogen farvning af Nissl-billedet med kromalun. Om gliacellekernerne udtalte han, at disse efter indflydelse af trikloreddikesyre blev meget svage, efter svovlsyre var kernerne noget stærkere, men samtidigt sås nervecellerne kun som svage skygger. Om saltsyre udtaltes, at nervecellerne næsten var usynlige. Efter salpetersyre var nervecellerne komplet usynlige.

Einarson foretog endvidere forsøg over forskellige syrers indflydelse på 5 my tykke snit af kaninrygmarv monterede på objektglas. Efter påvirkning med 5% saltsyre, 5% salpetersyre og 5% svovlsyre ved 65° C. i næsten to timer var der efter farvning med gallocyanin overhovedet ikke antydning af Nissl-substans.

Forfatteren opstillede herefter den teori, at Nissl-substansen bestod af mindst tre histologiske komponenter: a) basofil kromatinsubstans, b) basofilt protein og c) acidofil kromatinsubstans, hvoraf a farvedes med metylgrønt, både a og b med gallocyanin og b og c med gallaminblåt og i lettere grad med eosin. Af disse er a og b opløselige i stærke syrer, medens c er uopløselig i stærke syrer. Denne teori er tilfulde blevet bekræftet af *Hydéns* omfattende arbejde over æggehvideomsætningen i nervecellen (1943) undersøgt ved hjælp af ultraviolet absorptionsmikroskopi.

Einarsons teori giver en forklaring på, hvordan vi er i stand til at få et Nissl-billede frem efter afkalkning med stærke syrer ved hjælp af hæmatoxylin, medens dette ikke lader sig gøre ved hjælp af gallocyanin. Da såvel *Einarsons* som *Hydéns* arbejder viser, at kromatinet og de kromatoide substanser (Nissl-substans) har tilknytning til nervecellens vækst og funktion, og da man i *Einarsons* gallocyanin-kromalunlakfarvemetode har en pålidelig, progressiv, elektivt farvende metode til fremstilling af Nissl-substansen, fremgår det, hvor magtpåliggende det er at finde en afkalkningsvædske, som tillader farvning af Nissl-substansen med gallocyanin.

De foreløbige undersøgelser pegede i retning af organiske syrer, helst i form af stødpudeopløsninger, som gav hurtig afkalkning trods ret høj pH.

Anvendelse af meget lave normaliteter af syrerne, anvendelse af brugte opløsninger og anvendelse af høje eller lave temperaturer har i så henseende intet værdifuldt ydet.

Den anden metode til bedømmelse af afkalkningens indflydelse på gallocyaninfarvningen (af kerner) var fotometri af syrebehandlede kernesnit, farvede med gallocyanin.

β) *Fotometri på alkoholfixerede kernesnit.* Fremstillingen af kernesnit er tidligere beskrevet. Det skal derfor blot nævnes, at det drejer sig om paraffinsnit af centrifugerede miltkerner isolerede efter *Marchaks* metode. Snittene monteredes på objektglas og kunne bekvemt mærkes med diamantstift. Snittene afparaffineredes, skylledes i vand og i destilleret vand og kunne nu anvendes i de under knoglemodelforsøgene omtalte afkalkningsforsøg. Når afkalkningen var slut, skylledes præparaterne i rindende vand i 24 timer, afskylledes i destilleret vand og farvedes med gallocyaninkromalunlak i 24 timer. Herefter skylledes de atter i destilleret vand, afvandedes og monteredes i balsam til senere fotometri.

Ved fotometri anvendtes et Pulfrich fotometer opstillet på optisk bænk. Skalaen på højre side af apparatet stilledes på 100, og kernesnittene anbragtes foran det lille diafragma i kuvetteholderen på højre side. Aflæsningerne, der foregik i dunkelt lokale, kunne efter indstillingen på venstre skala foregå med hele tal, som direkte angav den gennemfaldende lysmængde i %. Et stærkt farvet præparat gav lave tal, medens meget blege præparater gav høje tal. Heldet vilde, at de aflæste tal kom til at ligge i fotometerets bedste arbejdsområde, fra ca. 10% til 70%.

Efter med forskellige filtre at have forsøgt at gøre aflæsningen så let som mulig, blev filter no. 10 = S 66 foretrukket. Det var et rødfilter, som nogenlunde svarede til de farvede præparaters komplementærfarve.

Aflæsningen kunne foregå med meget stor nøjagtighed. For at sikre mig mod fejltagelser var der på praktisk talt alle objektglas monteret et dobbelt sæt kernesnit, så der hver gang foretoges dobbeltaflæsning. Middeltallet af disse to anvendtes.

For yderligere at sikre mig mod fejlkilder foretoges forskellige kontrolundersøgelser, idet der foruden undersøgelse af gallocyanin af forskellig alder (se tavlen side 74) foretoges undersøgelse af forskellige kernesnitprøver efter farvning med gallocyanin. De fotometriske middelværdier var følgende: 13, 11, 12, 11.5, 13, 11, 10 og 12. Altså en meget lille spredning.

Hertil kommer, at der lig *Einarson* (1945) foretoges undersøgelse af forskellige dæk- og objektglas' gennemtrængelighed for lys. Resultatet blev følgende:

Vandklart	objektglas,	tyndt	89
—	—	, tykt	88
grønt	—	, tysk dækglas	86
—	—	, engelsk dækglas	86

Det ses heraf, at de anvendte glas ikke kan give anledning til større fejlmålinger.

Forud for dette er der forsøgt en målemetode, hvor præparaterne anbragtes på objektbordet af et mikroskop. Man søgte at aflæse udslaget på en fotocelle, anbragt på okularets plads. Udsvingene var imidlertid alt for små, selv ved farveforskelle i præparaterne, som var yderst evidente. Fejlen ved fotocellen var, at den arbejdede efter logaritmisk skala, medens der var brug for en målemetode efter lineær skala.

Det kan efter dette ikke forekomme påfaldende, at der i mine undersøgelser er lagt stor vægt på resultaterne af disse fotometerundersøgelser over kernefarvningen med gallocyanin. Først og mest fordi metoden forekommer mig noget nær det ideelle i kraft af sin objektivitet, en objektivitet som man hverken kan opnå i sammenligningsmikroskop, selv med anvendelse af gallocyanin, eller kan opnå med almindelige, regressive farvninger ved anvendelse af sammenligningsmikroskop. Desuden giver metoden et exact grundlag, hvorpå man kan bygge sine iagttagelser over de forskellige syrers indflydelse på kernefarvningen.

Resultaterne af de systematiske undersøgelser i knoglepladelmodelforsøgene I, II, IV, V, VII, VIII, X, XI og XII fremgår af omstående tabel 18.

I de 1 og 2 normale syreforsøg fremgår det klart, at den bedste kernefarvning er opnået ved anvendelse af myresyre og svovlsyrling. Endvidere ses det, at anvendelsen af brugte syrer ikke yder nogen større hjælp lige med undtagelse af enkelte af de allersvageste organiske syrer, hvis fotometertal falder noget. For saltsyrens og salpetersyrens vedkommende er der endog en utvivlsom stigning i tallet som udtryk for en dårligere farvbarhed af vævene ved anvendelse af disse syrer i brugt tilstand. Anvendelse af 1/10 normale syrer virker heller ikke særligt begunstigende på kernefarvningen. Anvendelse af høj temperatur (33° C.) virker på een undtagelse nær (trikloreddikesyre) i høj grad skadeligt på kernefarvningen.

Tabel 18

Fotometerværdier ved forskellige syrer under forskellige betingelser

Syrer	2 n ubrugt stuetemp. Rtg. fors. I	1 n ubrugt stuetemp. Rtg. fors. II	2 n brugt stuetemp. Rtg. fors. IV	1 n brugt stuetemp. Rtg. fors. V	2 n ubrugt overafkalkn. stuetp. Rtg. fors. VII	1 n ubrugt overafkalkn. stuetp. Rgt. fors. VIII	$^1/_{10}$ n ubrugt stuetemp. Rgt. fors. X	1 n ubrugt 33° Celsius Rtg. fors. XI	1 n ubrugt 4° Celsius Rgt. fors. XII
HNO_3	18	13	30.5	14.5	32	26	25.5	26.5	19.5
HCl	21.5	14	41	17.5	44.5	32	18.5	34	19
H_2SO_3	9.5	9	16	10.5	22.5	32.5	12	41.5	23.5
H_3PO_4	12	13.5	12.5	8.5	13	14	17	25	17.5
H_2CrO_4	50	50.5	47	41	62.5	62	46	55	40.5
HCOOH	7.5	6	7.5	7.5	9	11	14	13.5	18.5
CH_3COOH	15	11.5	7.5	10	12	17.5	21	24	13
CCl_3COOH	41.5	18.5	40	18.5	42	32	19	24	20.5
$C_2H_4OHCOOH$	11.5	11.5	11	9	11	17	13.5	11	15.5
$C_6H_8O_7,H_2O$	17	17	7.5	5	27	?	17.5	?	16

Dette er særligt udtalt for svovlsyrling, formentlig som følge af svovlsyrlingens reducerende egenskaber og deraf betingede delvise omdannelse til svovlsyre, fremmet af den høje temperatur. Anvendelse af lav temperatur (4° C.) er ikke stort bedre. Især går det ud over myresyrens ellers så fortrinlige egenskaber.

I forbindelse med tallene for de systematiske undersøgelser er det værd at lægge mærke til, at tallene for salpetersyrealkohol er 48, for salpetersyrefloroglucin 15 og for salpetersyreformol 19. Da alle disse syreblandinger i henseende til indhold af aktive syrer er 1 normale, vil det af ovenstående tabel fremgå, at de alle nedsætter kernefarvbarheden. Nedsættelsen er størst for den alkoholiske opløsning og mindst for salpetersyrefloroglucin. *Der er et tydeligt fald i kernefarvbarhed efter salpetersyreformol (den mest anvendte afkalkningsvædske).*

I sammenhæng med undersøgelser over Lanthans eventuelle beskyttende virkning på kernekromatinet og kromatoiderne er det af interesse at få at vide, at fotometertallet for 3 n salpetersyre er 37 og for 3 n salpetersyre, som er 0.05 molær med hensyn til lanthannitrat, er 39, altså uden sikker forskel. Endvidere at tallet for 3 n eddikesyre er 6 og for eddikesyre-lanthanacetat er 4.5, altså noget mindre for sidstnævnte. Dette var at vente, da pH ved tilsætning af lanthanacetatet stiger fra 1.95 til 2.8. Der dannes en stødpudeopløsning, men en stødpudeopløsning, hvis afkalkende virkning efter mine undersøgelser er lig 0.

Myresyreformiatblandingerne giver alle gode kernefarvningsværdier som følger:

Myresyreformiatblanding	no. 1	5.5
—	— 2	6.5
—	— 3	8.0
—	— 4	10.0
—	— 5	9.0
—	— 6	8.5
—	— 7	10.0

Myresyreformiatblanding no. 8	8.5
— - 9	9.5
— - 10	7.5

For den rene myresyre er tallene: 10%:10; 20%:10; 40%:19 (altså stigende), og for den koncentrerede myresyres vedkommende var syrevirkningen så stærk, at præparatet ødelagdes under forsøget.

Da det af tabellen over fotometerværdierne i de systematiske forsøg fremgår, at myresyren udmærker sig ved at give fotometerværdier, som gennemgående ligger under værdierne for kontrolpræparaterne, faldt den tanke ind, at myresyre på een eller anden måde måtte forstærke gallocyaninfarvningen. I den anledning iværksattes et par forsøg: I: (14. 10. 47 kl. 1400 — aflæsning 15. 10. 47 kl. 1400)

4 cc. farvelak + 0 cc. HCOOH + 4 cc. vand	61%
4 - — + 1 - — + 3 - —	59%
4 - — + 2 - — + 2 - —	55%
4 - — + 3 - — + 1 - —	53%
4 - — + 4 - — + 0 - —	50%

Den samlede vædskemængde var den samme med samme indhold af den farvende gallocyaninkromalunlak. Efter 1 døgns forløb var fotometerværdierne forskellige, og mindst i opløsninger med mest myresyre.

Der blev herefter lavet et tilsvarende forsøg med salpetersyre, ligeledes 1 normal: II (16. 10. 47 kl. 1500 — aflæsning af fotometerværdier den 16. 10. 47 kl. 1800)

1) 4 cc. farvelak + 0 cc. HNO_3 + 4 cc. vand	66%
2) 4 - — + 1 - — + 3 - —	70%
3) 4 - — + 2 - — + 2 - —	82%
4) 4 - — + 3 - — + 1 - —	96%
5) 4 - — + 4 - — + 0 - —	100%

Allerede efter 3 timers forløb fandtes stor spredning i værdierne med farveløshed af opløsning 5. Ved en senere aflæsning (20. 10. 47) fandtes vædske no. 2 næsten farveløs, medens vædskerne no. 3, 4 og 5 var fuldstændigt farveløse.

Forsøgene ser besnærende ud og passer ydermere med de farvetekniske resultater på vævene. Blot er analogien med vævene ikke umiddelbart forståelig, idet vævene altid skylles 24 timer i rindende vand, så ethvert spor af syren forlængst må være fjernet. En eventuel ringe rest af syren kan man vanskeligt tro skulle være i stand til at give så udtalte forandringer i farvbarhed, som man f. eks. ser ved svovlsyrling, der ellers anses for at være flygtig.

Om forskellene i farvbarhed skyldes syrernes forskellige indflydelse på nucleinsyrerne, eventuelt forskydning af disse æggehvidestoffers isoelektriske punkter, må indtil videre forblive ubesvaret.

4. I tilslutning til disse målinger skal lige omtales betydningen af *overafkalkning* (syrepåvirkning udover den for afkalkningen nødvendige tid). Det vil af tabellen over fotometerværdierne i de systematiske afkalkningsforsøg ses, at overafkalkning med 2 normale syrer bevirker en betydelig forringelse af farvbarheden for

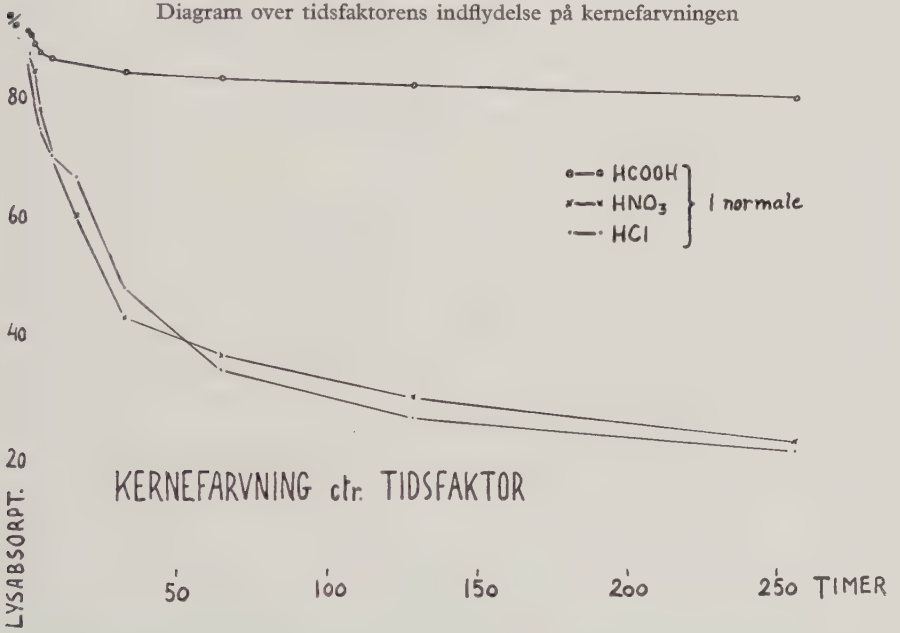
de tre stærkeste syrers vedkommende. Mærkeligt nok er forholdet endnu mere udtalt for de 1 normale syrers vedkommende med undtagelse af fosforsyren, der viser næsten samme fotometerværdi. Meget påfaldende er det store fald i farvbarhed for svovlsyrlingens vedkommende, sandsynligvis en følge af denne syres reducerende egenskaber.

Til sammenligning skal anføres, at der ved tilsvarende overafkalkning med myresyreformiatblandingerne no. 5–10 er fundet følgende værdier: 9.5, 8, 9.5, 9.5, 9 og 11, altså værdier liggende omkring 9.5. Det vil sige, at man roligt kan lade præparatet blive i syren ud over den tid, der er nødvendig for afkalkningen. Dette er af betydning ved afkalkning i almindelighed, hvor man hverken røntgenfotograferer eller står parat til at afbryde afkalkningen, så snart den er tilstrækkelig.

I det hele taget spiller tidsfaktoren en stor rolle ved afkalkningen med stærke syrer, som det ses af nedenstående diagram:

Figur VIII

Diagram over tidsfaktorens indflydelse på kernefarvningen



Det ses, at lysabsorptionen er stærkt faldende for de stærkt dissocierede syrer, men næsten ikke for myresyrens vedkommende. Efter førnævnte fotometermålinger på myresyreformiatblandingerne skulle tidsfaktoren spille endnu ringere rolle for myresyreformiatblandinger end for den rene myresyre.

Myresyreformiatblandingerne er derfor afkalkningsvædsker med de kvalifikationer, der efterlystes i indledningen af mit arbejde. For oversigtens skyld skal dog som afslutning på disse afsnit om farveresultater i tilslutning til afkalkning gives en oversigt over afkalkningstid sammenlignet med kernefarvning med gallocyanin.

5. *Afkalkningstider sammenlignet med kernefarvningsresultater.*

De indledende ribbensmodelforsøg viste klart, at man fik en hurtig afkalkning med de totalt dissocierede syrer, men samtidigt dårlige kernefarvningsresultater. De svage organiske syrer gav meget langsom afkalkning, men bevarede kernefarvningen nogenlunde. De middelstærke organiske syrer, i særdeleshed myresyren, viste sig at være i besiddelse af ret gode afkalkende egenskaber, uden at det derved i væsentlig grad gik ud over de efterfølgende farvninger.

I forhold til disse indledende undersøgelser, hvor bedømmelsen af afkalkningens afslutning var usikker, og hvor bedømmelsen til syvende og sidst beroede på en skønsmæssig vurdering, var knoglepladeforsøgene mere exakte. I disse forsøg blev afkalkningstiderne og -forløbet fastlagt ved røntgenfotografering og udtrykt talmæssigt. Kernefarvningerne kunne ved hjælp af specielt forfærdigede kernesnit udtrykkes talmæssigt ved anvendelse af *Pulfrichs* fotometer. Disse tal kunne umiddelbart sammenlignes med tallene for afkalkningstid.

Ved beregning af middelværdierne for afkalkningstider og fotometerværdier for kernefarvningen i forsøgene over de 1 normale syrer under forskellige betingelser, kunne man for de systematiske syreforsøg opstille tavlen side 96. Denne tavle viste forholdene for afkalkningstid og kernefarvningsresultater ganske svarende til det, der blev fundet i de indledende ribbensmodelforsøg. I særdeleshed viste den, at myresyren ved god bevaren af kernerne ved gallocyaninfarvningen gav den hurtigste afkalkning.

Ved den herpå følgende undersøgelse af forskellige koncentrationer af myresyre tillige med myresyrecitrat samt forskellige myresyreformiatblandinger påvistes, at man afkalkede med praktisk talt lige så stor hastighed med myresyreformiatblanding no. 10 som med 20% myresyre, til trods for at pH af myresyreformiatblandingen kun var 2.2, medens den bedste myresyres pH var 1.1 (altså en 10 gange større brintionkoncentration) (konferer diagrammet side 98).

Denne forskel i pH gjorde sig mindre gældende ved fotometrisk kernefarvningsbestemmelse, idet tallet for den rene myresyre (20%) var 10, medens det for myresyreformiatblandingen no. 10 var 7.5. Men hertil kommer, at myresyreformiatblandingen i forhold til de rene myresyrer gav ganske anderledes distinkte Nisslbilleder efter farvning med gallocyanin.

Fixation contra afkalkning.

Ved konklusion over forskellige fixationsvædskers anvendelighed til postmortel og til intravital fixation fandtes, at Kaformacet og Susa ydede de bedste tjenester (se side 61–62).

I forbindelse med afkalkningen var det af en vis interesse at få undersøgt, hvilken fixationsvædske var bedst til hindring af kvældning eller skrumpning — et forhold, som i ikke ringe grad har interesseret mange af de forfattere, der har beskæftiget sig med afkalkningens problemer. Efter omstående skema har meningerne hidtil været noget delte.

Denne meningsforskel må tilskrives anvendelse af forskellige koncentrationer af syrer, forskellige syreblandinger og forskellige former for efterbehandling.

Med henblik på forskellige fixationsmidlers beskyttende effekt overfor en senere

Skema IX

Spørgsmålet kvældning/skrumpning i forskellige væv efter påvirkning med forskellige syrer

Syreart	Kvældning	Minimale forandringer	Skrumpning
HNO_3	Busch, Mc. Clung, Krause, Schaffer, Ziegler	Haug, Herxheimer, Jaffe, Lang & Hasslhofer, Williams, Wilson	(Schaffer)
HCl	Mc. Clung, Haug, Jaffe, Krause, Lee, Politzer, Szymonowicz, Ziegler		(Schaffer)
H_2SO_3	Mallory & Wright, Schaffer	Mc. Clung, Herxheimer, Jaffe	(Schaffer)
H_3PO_4	Schaffer	Haug, Schaffer, Ziegler	(Schaffer)
H_2CrO_4		Haug, Herxheimer	Mc. Clung, Lee
HCOOH	Herxheimer, Jaffe, Krause, Langeron, Schaffer, Schmorl		Ziegler
CCl_3COOH	Herxheimer, Jaffe, Langeron, Romeis, Schaffer, Schmorl, Westin		Lang & Hasslhofer (Schaffer)
$C_2H_4OHCOOH$	Busch, Mc. Clung, Lee	Haug	Ziegler
$C_6H_8O_7$, H_2O			Ziegler
HCOOH-citrat		Morse	

(Schaffer) = forholdene i knoglevæv.

syrepåvirkning i form af mindre kvældning eller svulst af vævene, foretoges en sammenlignende undersøgelse af *Carazzi*-farvede præparater fra modelforsøgene II, IV og V (fixation med henholdsvis Kaformacet, Susa og *Carnoy-Lebruns* vædske). De anvendte syrer var: 5% saltsyre, 5% salpetersyre, 5% svovlsyrling, 5% svovlsyre, 5% trikloreddikesyre, 10% myresyre, 10% mælkesyre og 10% citronsyre.

I alle grupper af præparater kom der uanset fixationsvædske mere eller mindre udtalte skrumpninger. Disse skrumpninger var mest udtalte for de stærkeste syrers vedkommende, ganske særligt for svovlsyren, som samtidigt næsten ødelagde mulighed for senere kernefarvning af præparaterne.

Fixation med *Carnoy-Lebruns* vædske (modelforsøg V) hindrede tilsyneladende i større udstrækning end de andre fixationsvædsker indtræden af skrumpninger. Fordelen er kun tilsyneladende, idet fixation med *Carnoys* vædsker giver anledning til udtalte skrumpninger, således at kun anvendelsen af de allerstærkeste syrer kan få vævet til at skrumpe yderligere. Det er af denne grund, at man inden for den *carnoy*-fixerede gruppe og ved sammenligning med præparaterne i denne gruppe med de kaformacet- og susa-fixerede præparater ser en så lidet udtalt skrumpning i tilslutning til syrebehandlingen.

Ved sammenligning mellem de susa- og kaformacet-fixerede præparater ses muligvis en lille fordel ved anvendelse af Susa-vædske. Forskellene er imidlertid så små, at det næsten ikke er muligt at registrere dem.

Når fixationen ellers er god, spiller fixationens art ingen større rolle ved det histologiske billedes udseende i tilslutning til afkalkning.

Fremkomst af forskellige grader af skrumpning eller kvældning ved iøvrigt samme fixation og syrepåvirkning må snarere tilskrives en forskellig efterbehandling.

F. Vurdering af efterbehandlingens betydning

I almindelighed forstår man ved efterbehandling i tilslutning til afkalkning neutralisation af syrerne ved at anbringe præparaterne i alkalisk vædske. I de fleste tilfælde anvendes opløsninger af natriumsulfat, lithiumsulfat eller lithiumcarbonat. At der ikke er enighed om, hvilken form for efterbehandling, man bør anvende, ses tydeligt af oversigten over efterbehandling.

Skema X

Oversigt over efterbehandlingen ved forskellige syrer

Alle syrer	Alun	Herxheimer, Krause, Schmorl
—	Akal. vædske	Hopewell-Smith
—	Lithiumsulfat	Jaffe
—	Vand	Mallory & Wright
Salpetersyre	5 % kalialun	Bauer, Brinch, Williams, Lang & Hasslhofer, Schaffer, Wagoner, Juul & Vraa-Jensen, Kristensen
—	5 % lithiumsulfat	Støhr, Saxén, Werner
—	95 % alkoh. + $CaCO_3$	Thoma
—	5 % natriumsulfat	Weidenreich, Møbius, Werner, David, Mygind, Alexander & Fischer
—	Mættet lithiumcarbonat (vandig)	Wilson
—	Vand	Eschweiler, Manasse, Wada, Wittmaack, Yoshii, Plum & Pindborg
Myresyre	70 % alkohol	Mc. Clung, Jaffe, Romeis, Schmorl
Myresyre-citrat	Vand	Evans & Krajian, Morse, Wagoner
Saltsyre	Vand	Reissner
Eddikesyre	Vand	Kolin
Trikloreddikesyre	Alkohol	Jaffe, Romeis, Schmorl, Westin
—	Vand	Mallory & Wright, Krause

Der har været anbefalet forskellige alkaliske vædsker (alun, lithiumsulfat, natriumsulfat og lithiumcarbonat), men desuden alkohol (i et enkelt tilfælde indeholdende en opslemning af finfordelt kalkpulver (*Thoma*)). Desuden er i flere tilfælde anbefalet skylning i rindende vand. Således skyller *Morse* efter afkalkningen med rindende vand, med den motivering, at den natriumcitrat, som findes i den af forfatteren anbefalede myresyrecitratblanding, skulle hindre skrumpning.

Schaffer er den eneste, der har beskæftiget sig med systematiske undersøgelser over syrernes kvældende og skrumpende indflydelse. Ved disse undersøgelser undersøgte han forholdene efter påvirkning af 1 cm lange senestykker og udstansede stykker ledbrusk fra metacarpalknogler med syrer. Der blev beskrevet ændringer i dimensioner, længde og tykkelse, ligesom der foretoges en beskrivelse af præparaternes farve, gennemskinnelighed og konsistens. Før disse forsøg havde

Schaffer foretaget kvældnings- og skrumpningsundersøgelser på elfenbensstifter og herved fundet, at der i samtlige tilfælde ved efterbehandlingen optrådte kvældning, mindst ved efterbehandling med 5% kalialun. Iøvrigt var det vist, at kvældningen kunne gå tilbage til den procentiske middel for simpel vandoptagelse ved udvasken i rindende vand.

Motiveringen for anvendelse af senevæv i stedet for elfenben var, at senevævet var mere følsomt overfor syrepåvirkning end elfenbenet. Afsyringsforsøg, som viste gode resultater for senevæv, måtte derfor også med fordel kunne anvendes ved knogle- og tandvæv.

Disse seneforsøg viste, at 2–10% salpetersyre næsten ikke fremkaldte forandringer, medens de øvrige syrer fremkaldte kvældning eller glasagtig gennemsigtighed af præparaterne (svovlsyrling, trikloreddikesyre, koncentreret myresyre og koncentreret fosforsyre). Selv om syren lader vævet uforandret, kommer der ved skylning i rindende vand i tilslutning til afkalkning med saltsyre, salpetersyre og trikloreddikesyre betydelige kvældninger, der kan skade vævet.

Derfor foretog *Schaffer* forsøg over efterbehandling med forskellige vædsker i tilslutning til behandling med 3% salpetersyre i 2 dage. Dette skulle ikke skade vævsstrukturerne efter det første forsøg over seners forhold til syrer. Det viste sig, at den kvældningshæmmende effekt var bedst for kalialun, men stærkt varierende for forskellige styrker af denne. Der foretoges derfor yderligere et par forsøg. Endelig foretoges forsøg over forskellige »beskyttende« stoffers virkning (kogsaltopløsning, alkohol, floroglucin og formalin). Der fandtes ingen effekt ved sidstnævnte forsøg.

Resultatet af efterbehandlingsundersøgelserne blev, at 5% vandige opløsninger af lithium- eller natriumsulfat havde den bedste virkning.

Det er imidlertid ikke korrekt at betegne eventuel behandling med alkaliske vædsker i tilslutning til afkalkning for efterbehandlingen. Herunder hører i virkeligheden hele proceduren fra vævet tages ud af afkalkningsvædsken, til det foreligger færdigt i det histologiske snitpræparat. Specielt har dehydreringen i høj grad mulighed for at influere på vævsstrukturerne og -dimensionerne.

På den anden side er eventuel behandling med alkalisk vædske efter afkalkningen den eneste faktor, der kan varieres under efterbehandlingen i almindelighed, idet præparaterne alligevel skylles, dehydreres og indlejres.

Det er derfor søgt klarlagt, om behandlingen med natriumsulfat eller lithiumsulfat virkede heldigt, var ligegyldig eller virkede uheldigt på slutresultatet. Ved bedømmelsen af dette forhold er anvendt to fremgangsmåder: 1) Undersøgelse af vævsfarvningen i sammenligningsmikroskop eller fotometrisk på kernemodeller, 2) Undersøgelse af volumenændringer ved målinger med pyknometer, foretaget på knoglevæv og på forskellige vævsstykker. Spørgsmålet var i korthed, om man skulle efterbehandle med alkalisk vædske, eller om det var nok at skylle i rindende vand.

1. *Farveundersøgelser.*

a. *Undersøgelse i sammenligningsmikroskop.* Det første forsøg foretoges den 22. 5. 47 og bestod i, at et stykke sublimatalkoholfixeret levervæv tillige med en ring-

formet knogleplade fra hesteforpibe underkastedes afkalkning i 5% salpetersyre. Vævet blev derefter skåret i to halvdele, hvoraf den ene blot skylledes i rindende vand i 24 timer, medens den anden først anbragtes i 5% vandig opløsning af natriumsulfat i 1 døgn og først derefter skylledes i 24 timer i rindende vand som almindeligvis foreskrevet.

Efter indlejring i paraffin blev der skåret snit, som farvedes med:

Einarsons gallocyaninkromalunlak,
Bøhmers hæmatoxylin,
1% vandig oplôsning af toluidinblåt
1% vandig opløsning af eosin.

Ved kernefarvningen med gallocyanin kunne der ikke påvises sikre forskelle, men ved farvning med hæmatoxylin var der en tydelig bedrefarvning af kernerne i det præparat, der ikke havde været i natriumsulfat.

Toluidinblåt viste ligeledes en bedre farvning af kerner og protoplasma i det præparat, der ikke havde været behandlet med natriumsulfat.

Endelig viste protoplasmafarvningen med eosin en udtalt bedrefarvning af præparatet, der ikke var blevet natriumsulfatbehandlet.

Der fandtes således ingen fordel ved indskydelse af natriumsulfat inden skylning i tilslutning til afkalkning.

b. *Undersøgelse ved fotometri.* Forsøget iværksattes på den måde, at kernepræparater monteret på objektglas efter afparaffinering anbragtes i 1 normal salpetersyre og i myresyreformiatblanding nr. 10 i tilslutning til nogle undersøgelser over kvældning-skrumpning af knoglevæv, som påbegyndtes 5. 11. 47.

Kernepræparaterne fulgte knoglestykkerne, idet de toges ud ved fuldendt afkalkning, hvilket for salpetersyrens vedkommende vil sige 6 timer, for myresyreformiatblandingen ca. 24 timer.

Der var anvendt fire kernepræparater i forsøget, så man kunne undersøge følgende forhold:

Salpetersyre til vand (24 timer),
Salpetersyre til natriumsulfat (24 timer), til vand 24 timer,
Myresyreblanding til vand i 24 timer,
Myresyreblanding til natriumsulfat i 24 timer og dernæst til vand 24 timer.

Herefter skylledes præparaterne i destilleret vand og farvedes med gallocyanin. Ved fotometri fandtes følgende resultater (filter S 72):

Salpetersyre til vand	14	—12	= 13
Salpetersyre til natriumsulfat	16.5	—15.5	= 16
Myresyreblanding til vand	7	— 6.5	= 6.25
Myresyreblanding til natriumsulfat	9	— 8	= 8.5

Farvningen efter afkalkning med myresyreblandingen er meget stærkere end med salpetersyren. Det ses, at de to kernepræparater på hvert objektglas følges udmærket ad. Endelig ses nogen forskel mellem fotometerværdierne for præparaterne med eller uden efterbehandling med natriumsulfat, talende til fordel for, at *man af hensyn til farvningen ikke bør anvende natriumsulfat.*

2. *Undersøgelser over volumenændringer med pyknometer.*

Teknikken i disse undersøgelser er den samme som anført af *Erik Johansen* i dennes disputatsarbejde: »Undersøgelser over det indbyrdes størrelsesforhold mellem cornea og lens crystallina hos mennesket« på side 19. De knogle- og vævsstykker, som skulle undersøges med henblik på volumenændringer, undersøgtes ved hver fase i undersøgelsen på samme måde: De vejedes i en elektrisk dæmpet analysevægt (nøjagtighed 1/1000 g) sammen med et pyknometer indeholdende 10 cc. destilleret vand — vægten noteredes. Derefter anbragtes vævsstykkerne i pyknometeret, hvorved noget vand fortrængtes svarende til vævsstykkets volumen. Differencen mellem den først noterede vægt og den sidste vægt regnedes lig vævsstykkernes volumen, idet temperaturen var uforandret under hvert enkelt forsøg. Ydermere viste tarering af pyknometeret med vand fra forsøg til forsøg den samme vægt (22.665 g).

Det første forsøg (28. 10. 47) foretoges med henblik på at bestemme eventuelle forskelle i volumen af knoglestykker af passende størrelse (ca. $\frac{1}{2} \times 2\frac{1}{2}$ cm — vægt ca. 0.500 g), efter at disse var blevet afkalket med salpetersyre og myresyreformiatblanding nr. 10 med påfølgende skylning i rindende vand i 24 timer.

Tabel XIX

Volumen før afkalkningen og efter afkalkningen

	Beg. vol.	Slutvol.	Diff. (g)	% af opr. vol.	middel %
HCOOH-bl.	0.250	0.231 g	— 0.019	7.6	6.3
	0.256	0.241 g	— 0.015	5.9	
	0.276	0.261 g	— 0.015	5.4	
1 n. HNO_3	0.250	0.231 g	— 0.019	7.6	5.8
	0.298	0.284 g	— 0.014	4.7	
	0.218	0.207 g	— 0.011	5.1	

Tallene i tredie kolonne angiver den absolutte skrumpning, medens tallene i den 4. kolonne angiver den relative skrumpning udtrykt i % af det oprindelige volumen. Middeltallene indenfor de to grupper af syrer viser praktisk talt ingen forskel, således at der ved efterbehandling med vand ikke er forskel på de to syrearter i henseende til skrumpning af knoglevæv.

Et tilsvarende forsøg startedes den 5. 11. 47, hvor det var hensigten at bestemme effekten af efterbehandling med natriumsulfat (5% vandig opløsning) contra skylning i rindende vand alene.

Opstillet på tilsvarende måde som ovenfor fik forsøget resultatet som vist i tabel XX.

Forskellene er heller ikke her særligt store, men det ses dog, at myresyreformiatblanding—vand giver den mindste skrumpning. De øvrige grupper: Salpetersyre—vand, salpetersyre-natriumsulfat og myresyreformiatblanding nr. 10—natriumsulfat giver praktisk talt samme tal.

Tabel XX

Volumenbestemmelse ved afkalkning med og uden natriumsulfat som efterbehandling

	Efterbeh.	Beg. vol.	Slutvol.	Diff. (g)	% af opr. vol.	middel %
HNO_3, n1	H_2O	0.241	0.230 g	— 0.011	5.8	5.85
		0.269	0.253 g	— 0.016	5.9	
	Na_2SO_4	0.276	0.261 g	— 0.015	5.4	5.6
		0.241	0.227 g	— 0.014	5.8	
HCOOH-bl.	H_2O	0.316	0.305 g	— 0.011	3.5	4.0
		0.260	0.248 g	— 0.012	4.6	
	Na_2SO_4	0.238	0.225 g	— 0.013	5.4	5.7
		0.251	0.239 g	— 0.012	6.0	

Forsøgene er suppleret med forsøg over formolfixeret rygmarv og levervæv, idet volumenændringerne er undersøgt i tilslutning til behandling med natriumsulfat—rindende vand og i tilslutning til rindende vand alene (5. 5. 48), men desuden efter at vævene er ført til absolut alkohol (10. 5. 48). Der regnes med, at vævene efter at være ført til absolut alkohol højst kan skrumpe ubetydeligt ved at føres gennem xylol til paraffin. I hvert tilfælde er det meget vanskeligt at gennemføre pyknometermålinger på xylol, så flygtig som den er. Vanskelighederne var store nok ved målingen på alkohol, hvor denne var tilbøjelig til at fordampe.

Ved at foretage målinger i en bestemt rytme nåede fordampningen dog ikke at gøre sig gældende, og man behøvede herefter kun at omregne til vægten af det tilsvarende volumen vand ved hjælp af vægtfylden for absolut alkohol (0.8). Resultatet af de første målinger i dette forsøg blev følgende:

Tabel XXI

Volumenændringer efter afkalkning, med forskellig efterbehandling

		% af opr. volumen	middel %	(middel % for alkohol)
Lever	HNO_3 — H_2O	— 5.8	÷ 6.1	÷ 5.5
		— 6.4		
	HCOOH-bl. — H_2O	— 5.6	÷ 4.6	÷ 3.8
		— 3.6		
	HNO_3 — Li_2SO_4	— 8.7	÷ 8.4	÷ 13.2 ?
		— 8.2		
	HCOOH-bl. — Li_2SO_4	— 6.9	÷ 5.9	÷ 5.2
		— 5.0		
Rygmarv	HNO_3 — H_2O	+ 15.5	+ 19.8	÷ 2.6
		+ 24.1		
	HCOOH-bl. — H_2O	+ 26.5	+ 29.1	÷ 3.6
		+ 31.7		
	HNO_3 — $LiSO_4$	+ 23.0	+ 26.5	+ 3.2 ?
		+ 30.0		
	HCOOH-bl. — Li_2SO_4	+ 15.7	+ 16.2	÷ 3.8
		+ 16.8		

Ved at betragte middelprocentvariationen af volumen, efter at præparaterne var ført til vand, med eller uden behandling i lithiumsulfat i 5% vandig opløsning, sås det, at der var en stor forskel på levervæv og rygmarvsvæv. Levervævet var moderat skrumpet uanset behandlingen, medens rygmarvsvævet var svulmet stærkt uanset efterbehandlingen. For leverens vedkommende fandtes, at skrumpningen var mindst efter myresyreformiat—vand. For rygmarvens vedkommende sås, at svulsten var størst for myresyreformiat—vand, men til gengæld mindst for myresyreformiat—lithiumsulfat.

Ved at betragte den sidste kolonne for de dehydrerede vævsstykker, så man for levervævets vedkommende samme fordeling som ovenfor nævnt, hvor myresyre-formiatblandingen—vand fremdeles gav mindst skrumpning. For rygmarvens vedkommende vil man lægge mærke til, at der ikke var nogen forskel på, om vævet fra myresyreformiatblandingen føres direkte til rindende vand, eller der som mellemled er indskudt lithiumsulfat. Desuden så man, at skrumpningen for rygmarvens vedkommende var noget større ved behandling med myresyreformiatblanding i forhold til salpetersyre.

Det fremgår altså, at eventuelle forskelle i volumen til en vis grad bortelimineres ved vævenes dehydrering inden indlejringen, og det kan konkluderes, at hverken natriumsulfat eller lithiumsulfat har vist sig i stand til med sikkerhed at hindre skrumpning eller svulst af vævene. Når hertil lægges farveresultaterne, taler alt for, at *man bør forlade dette neutraliserende mellemled, der forlænger proceduren, ikke hindrer volumenændringer, men viser nedsættelse af farvningen af kernerne.*

Det var nu naturligt at overføre resultaterne fra det foregående afsnit om afkalkningen i den histologiske teknik på den histologiske teknik ved undersøgelse af labyrinthen.

Vanskelighederne ved fremstilling af det indre øre som tilfredsstillende histologiske præparater har, som det ses af den følgende oversigt over den tidligere anvendte teknik, været meget store — først og fremmest som følge af afkalkningen.

I oto-histologiens barndom har man væsentligst anvendt plukkepræparater i humor aqueus, jodserum, sukkeropløsninger, havvand og lignende, uden at have oversigt over de forskellige strukturers indbyrdes relation.

Selv ved indførelsen af lever- og hjernevæv som indlejringsmasse blev disse vanskeligheder ikke væsentligt mindre. Først ved fremkomsten af paraffin og celloidin i forbindelse med fremkomsten af bedre mikrotomer var man i stand til at skaffe sig gode præparater af det indre øre.

Den væsentligste vanskelighed bestod i konsistensen af det indre øres benede kapsel. Den kunne bortdissekeres med risiko for at lædere de yderst delikate strukturer indenfor kapslen, men den kunne også fjernes ved afkalkning.

Ganske vist råder man efterhånden over mange metoder til afkalkning. Fælles for dem alle er imidlertid, at man herved kompromitterer vævets farvbarhed. Vigtige farvemetoder af nervevæv umuliggøres. Dette genspejles i den kendsgerning, at man i værker om labyrinthhistologi, selv fra de sidste årtier *(Alexander & Fischer* og *Werner)*, finder angivet udpræparation af de bløde elementer i sneglen for at bevare disse til farvning med specialmetoder.

Min opgave bliver herefter med modelundersøgelserne som udgangspunkt at finde en metode, som tillader flest mulige farvninger, og helst på paraffinsnit.

Paraffinsnit foretrækkes på grund af den ringe tykkelse, i hvilken de kan fremstilles. De er derfor bedre egnede til cytologiske undersøgelser end celloidinsnit. Desuden er indlejring i paraffin af betydning, idet kun denne indlejring tillader farvning med *Einarsons* gallocyanin.

I arbejdet er indbefattet en undersøgelse af optimale fixationsforhold for marsvinelabyrinther samt en efterprøvning af forskellige farvemetoder.

KAPITEL IV

OVERSIGT OVER LABYRINTHENS HISTOLOGI

Corti (1851) udtalte i sine berømte undersøgelser over høreorganet: »La difficulté que présente l'étude des parties molles de l'organe de l'ouie et des organes des sens en général est évidente, si l'on considère le peu des résultats qu'ont eu les anatomistes, qui s'en sont occupis jusqu'à présent«. Cirka et hundrede år senere udtales praktisk talt det samme af *Agazzi* (1945): »L'histologie normale de l'oreille interne offre encore aujourd'hui un large champ de recherches. Cela est surtout à la structure compliquée de cet organe, aux difficultes que l'on rencontre dans l'application des méthodes histologiques et aux formations si delicates, renfermées dans l'os compacte du rocher«. Hertil kommer, at så godt som alle, der har arbejdet med det indre øres histologi, kommer med udtalelser på linie hermed: *Deiters* (1859), *Hasse* (1868), *Koelliker* (1852), *Loewenberg* (1870), *Moseley* (1872), *Kuhn* (1877), *Retzius* (1881), *Politzer* (1889), *Ranvier* (1888), *Bøhm & v. Davidoff* (1903), *Krause* (1903), *Wittmaack* (1906), *Møbius* (1926) og *Shambough* (1932). Vanskelighederne består dels i, at høreorganets sanseceller og støtteceller er meget følsomme overfor postmortelle forandringer, således at en hurtig fixation er påkrævet, dels i at man ved undersøgelse af det indre øre som helhed nødvendigvis må afkalke for at kunne fremstille snit. Blandt andet er det disse forhold, der får *Werner* (1940) til i sin indledning til histologiske metoder anvendt på det indre øre at udtale: »Wir sind von einer wissenschaftlich fundierten Technik noch weit entfernt«.

Scarpa (1800) var ifølge *Loewenberg* den første, som tog mikroskopet i anvendelse ved undersøgelsen af det indre øre. Ellers bestod *Scarpas* undersøgelser i at demonstrere opbygningen af den benede labyrinth makroskopisk-anatomisk.

Hannovers undersøgelse (1842) af det indre øre og de ret talrige undersøgelser i 1860-erne og 1870-erne er stærkt prægede af metoder, som væsentligst består i udpræparation af labyrinthen med påfølgende plukkepræparation af de enkelte elementer. For organon *Corti's* vedkommende omtaler *Corti*, at præparaterne er konserverede med arsensyre og iøvrigt indlejret i mastix mellem et par glasplader. Det pointeredes, at man ikke kunne se den epithelialpude, som udklæder sneglens indre i naturlig tilstand uden anvendelse af fuldstændigt friske præparationer i middelstærk sukkeropløsning. Der anbefaledes dissektion af dyret, mens det endnu var varmt. Herunder fjernedes en stor luns af epithelpuden, og denne konserveredes i en mættet opløsning af sublimat eller en opløsning indeholdende en smule kromsyre. Derefter omtaltes resultatet af påvirkning af de friske væv med

koncentreret kromsyre, kogning med alkohol, æter og syrer. Koncentreret eddikesyre ødelagde næsten fuldstændigt celleelementerne i disse epithelpuder (organon *Corti*). Samme syre i fortyndet tilstand fik dem til at svulme op, så man vanskeligt kunne kende dem, men efter behandling af disse celler med sublimat, kromsyre, alkohol eller æter ved høj temperatur fandtes disse celler ikke længere sensible overfor eddikesyren. Herom skrev forfatteren: »Ce fait est assez remarquable«. Iøvrigt anbefalede *Corti* til distinktion af de enkelte elementer, især kernerne i cellerne, at anbringe vævet i en opløsning af vand og alkohol, tilsat passende mængde sukker og karmin.

Hyrtl's undersøgelser (1845) er af samme art. Han indleder sine undersøgelser med, at de sædvanlige præparationsmetoder ikke nytter, når man vil lære pattedyrenes labyrinth at kende. Ganske vist kan man ved små gnavere og insektædere, hvor labyrinthen ligger fri af tindingebenet, ved åbning af trommehulen få et overblik over labyrinthen. Hos de større dyr, hvor labyrinthen er indkapslet, kommer man ingen vegne med mejsel og skrabejern. *Hyrtl* anbefalede derfor udstøbning af den hindede labyrinth ved injektion af en blanding af vox, harpiks og blyhvidt med påfølgende corrosion ved hjælp af saltsyre. Efter 1 uge kunne man skylle knoglevævet væk og en udstøbning af labyrinthen stod tilbage.

I *Koelliker's* »Handbuch der Gewebelehre des Menschen« fra 1852 findes der i den 637 sider store bog kun fire små sider om det indre øre, hvoraf det meste er referat af *Cortis* undersøgelser. Der anbefaledes undersøgelse af helt friske eller lige døde dyr og pointeredes nødvendigheden af anvendelse af sukker eller serum til fugtning af præparaterne, hvis man ville se disse helt normale. Endvidere lagdes vægt på en vis øvelse i blotlæggelsen og løsningen af de sarte dele, kombineret med tålmodighed. Tilsyneladende er *Koelliker* een af de første, der drager brugen af syrers afkalkende evne ind i det indre øres histologiske teknik, idet han for at se nerveplexet i zona ossea af sneglen fjernede kalksaltene ved hjælp af fortyndet saltsyre. Ved undersøgelse af gangliecellerne i dette område kunne efter hans mening kun en omhyggelig sønderplukning af den benede zone i et ikke skiftende medium føre til målet.

Harless (1853) synes at have været generet af nødvendigheden af denne plukkepræparation, idet han pointerede, at det i mindre grad kom an på et fuldstændigt overblik over labyrinthen end på kendskabet til de bestanddele, der ved deres anlæg tydeligt lod erkende fysiologiske formål.

Reissner (1854) anvendte væsentligst ældre fostre, fordi ossificationen i omegnen af labyrinthen i disse kun var ufuldstændig og derfor tillod isolation af de hindede dele. Men ellers angav forfatteren i lighed med *Koelliker*, at man ved ældre dyr må macere tindingebenene med saltsyre og udvaske i vand, hvorefter man var i stand til at skære axesnit med en skarp skalpel. Hvis man ikke behandlede med saltsyre, lykkedes præparatet sjældent, idet væggen rev ud.

1854 omtalte *Koelliker* virkningen af forskellige reagentia på cellerne i det cortiske organ. Ætsnatron og kalilud opløste disse celler øjeblikkeligt, og cellerne forsvandt sporløst. Det samme gjaldt behandling med fortyndet svovl- eller salpetersyre. Ret stærk eddikesyre fik dem til at svulme, æteralkohol fik dem til at skrumpe. Sidstnævnte gjaldt også kromsyre og koncentreret salt- eller sukkeropløsning. I vand kvældede de. Disse undersøgelser var sikkert ikke gjort med

henblik på betydningen af afkalkningen overfor celleelementerne, snarere gjort for at studere disse cellers modstandsdygtighed, som skik var ved histologisk undersøgelse af enkelte vævselementer i forrige århundrede. Alligevel synes det, som om disse undersøgelser har virket afskrækkende på lysten til at tage syrerne op til brug ved afkalkning af labyrinther, idet der først i 1869 fra tysk side *(Boettcher)* og 3 år senere fra engelsk side *(Pritchard)* omtales systematisk anvendelse af syrer til dette formål.

Også *Claudius* (1856) anvendte væsentligst fostre, hvor der på labyrintherne foretoges plukkepræparation og iagttoges dels med det blotte øje, dels med lup og mikroskop, efter at præparaterne var lagt mellem et par glasplader.

I 1860 fremkom *Deiters* med en interessant udtalelse om, at det histologiske og mikroskopiske kendskab til den hindede snegl hørte til den nyeste tid, og hvad der kendtes indtil 1851 hverken tilfredsstillede histologerne eller gav fysiologerne holdepunkter. Sneglens egentlige historie begyndte først med *Cortis* undersøgelser, hvis resultater ganske vist har måttet ændres meget. I dette og andre arbejder fra samme forfatters hånd fra 1860 og 1859 stod der intet direkte om den anvendte teknik ved præparationen, men det fremgår tydeligt af text og illustrationer, at der har været anvendt uddissekeren af organon Corti, der har været fremstillet plukkepræparater, der har været anvendt fixation i dobbelt kromsurt kali, og der er blevet indlejret i glycerin.

Hensen (1863) undersøgte tidligere sneglen frisk, senere benyttede han en opløsning af kaliumbikromat og natriumsulfat, 1½%, lige dele, med noget kromsyre til hærdning. Ydermere anvendte han, for at holde vævsafsnittene på plads, at sprøjte en koncentreret lim ind gennem det runde vindue. Der anvendtes farvning med karmin. Godt hærdede præparater opbevaredes i arsensyre.

Hasse (1868), der beskæftigede sig med frøens høreorgan, angav dette studium som et af de vanskeligste, man kunne påtage sig. Det krævede lang tids forarbejde og øvelse for at få oversigt over det kaos, som disse væv ellers gav indtryk af. Han anvendte udpræparation af den hindede labyrinth, idet han åbnede denne i ret stor udstrækning, indhældte konserverende vædske og roligt afventede virkningen af denne, medens der stadig fugtedes på det sted, hvor åbningen var blevet lavet. Præparaterne blev farvede med osmiumsyre og karmin og observeredes med det blotte øje, med lup og med mikroskop (forstørring op til 700 gange).

Boettcher (1869), der set med datidens øjne synes at have været en ret moderne indstillet tekniker, skrev en fortræffelig oversigt over de af ham anvendte metoder ved præparation af labyrinthen. Det fremgår desuden, at forfatteren for at finde de mest formålstjenlige metoder har anstillet flere forsøg. De anførte metoder er derfor sådanne, som forfatteren har fundet bedst. Yngre fostre lod forfatteren først ligge i Müllers vædske, under stadig fornyelse, i 6–7 uger med påfølgende hærdning i palladiumklorid (1:500) i 2–3 dage, før de blev skåret i 80–85% alkohol. Labyrinther fra nyfødte hunde og katte afkalkedes i 1% kromsyre i løbet af gennemsnitlig 8 dage med påfølgende hærdning i Müllers vædske. Stærkt forkalkede labyrinther blev underkastet en afkalkning i 5 og 10% saltsyre, hvor den sidste syntes dårligst. Desuden foretog forfatteren forsøg med fosforsyre, mælkesyre og citronsyre (ingen styrkeangivelse), men disse slog fejl. Afkalkningen skete for det meste lige efter, at hovedet var taget ud og endnu var varmt. Kun und-

tagelsesvis blev dyrerne først fixerede i Müllers vædske, så afkalket og atter anbragt i Müllers vædske. I almindelighed opstillede forfatteren som hovedregel, at *omgående afkalkning af høreorganet var bedst*. Forsøg med forudgående fixation med palladiumklorid og alkohol før afkalkning gav forfatteren det indtryk, at disse forholdsregler ingen værdi havde!

Til farvningerne anvendtes guldsalte til nervepræparater og karmin til studiet af nervecellerne i deres forskellige udviklingsstadier. *Boettcher* har også anvendt anilinfarvestoffer i form af salpetersurt Rosanilin, hvormed han fik »elegante oversigtspræparater«. Forøvrigt gik han ind for anvendelse af fortyndede opløsninger af dette farvestof og af karmin i glycerin. Snittene skylledes i vand, opklaredes i kreosot og indlejredes i dammarfernis eller kanadabalsam. Kreosoten fandtes at have nogen differentierende virkning, idet den ved at fjerne anilinen fra de steder, hvortil den ikke var varigt bundet, gav klare og skarpe billeder.

Før skæringen blev labyrintherne altid anbragt i alkohol og barberkniven fugtet godt med alkohol. Ældre fostre blev skåret på fri hånd, yngre fostre først efter indlejring i hjernemasse hærdet i alkohol. Andre indeslutningsmasser viste sig uanvendelige. Specielt fremhævede forfatteren, at det fra flere sider anbefalede paraffin ikke var brugbart, idet præparaterne blev forurenede samtidigt med, at det ikke tillod tilstrækkeligt tynde og regelmæssige snit!

Iøvrigt fremhævede *Boettcher* betydningen af undersøgelsen af ganske friske præparater i humor aquaeus til bedømmelse af de forskellige cellers konfiguration.

Til trods for *Boettchers* skepsis findes i 1870-erne stigende anvendelse af forskellige indlejringsmidler ved histologiske undersøgelser over det indre øre, ligesom barberkniven afløses af de mekanisk virkende mikrotomer. Men det fremgår tydeligt af den forholdsvis fyldige litteratur fra denne periode, at det indre øre trods bedre hjælpemidler fremdeles volder uhyre vanskeligheder. Stort set var teknikken ikke nået synderligt videre end på *Cortis* tid.

Loewenberg (1870) omtalte i forbindelse med egne undersøgelser over lamina spiralis den fortjeneste, der tilkommer *Scarpa*, *Reissner*, *Huschke*, *Corti*, *Koelliker*, *Claudius*, *Boettcher*, *Deiters* og *Hensen* ved de bidrag, de havde givet til studiet af disse organer. Men samtidigt pointerede han vigtigheden af, at der gøres rede for undersøgelsesteknikken: »L'histoire des differentes découvertes auxquelles nous devons nos connaissances actuelles sur la structure du limaçon, est la pour prouver l'importance des méthodes d'examen dans ses recherces, si tant est que l'importance de la méthode en matière anatomique ait besoin d'êter demontrée«, et forhold som tidligere forskere har syndet imod.

Loewenberg gjorde derefter rede for sin undersøgelsesteknik, hvor han først fremhævede betydningen af, at dyrene undersøgtes så hurtigt som muligt efter døden, da der ellers hurtigt opstod forandringer i de finere detailler. Han anbefalede at opbevare væv i kromsyre, kaliumbikromat eller Müllers vædske. Han gjorde opmærksom på nødvendigheden af at lave seriesnit, for at få et exact kendskab til detaillernes indbyrdes beliggenhed og forhold. Dette er ikke tidligere blevet fremhævet i forbindelse med ørets histologiske teknik. For ikke at få en forskydning af de indre dele i sneglen anvendtes en gummiopløsning, i hvilken sneglen anbragtes. Derefter lod han vandet fordampe. Der fremstilledes snit med en meget skarp barberkniv, efter at sneglen var spaltet i to dele gennem axen.

Hvis det drejede sig om en ossificeret snegl, foretoges på lignende måde indlejring og spaltning i to dele, hvorefter de benede dele fjernedes forsigtigt. Det tilføjedes dog, at man kunne fjerne kalksaltene ved hjælp af fortyndet saltsyre, men før indlejringen, idet saltsyren ikke kunne passere gummien.

Waldeyer skrev i *Strickers:* »Handbuch der Lehre von Geweben« (1871) om undersøgelsesmetoder: Humor aquaeus anbefales til frisk undersøgelse af sneglen. Til plukkepræparater anbefaledes 1/10% osmiumsyre og ¼–½% kogsaltopløsning. Til hærdede præparater 1% osmiumsyre. Pilceller isoleredes bedst med 0.05% kromsyre. Om teknikken stod der ellers: Man fjerner så meget knoglevæv som muligt med en kraftig, skærende tang, laver huller på sneglehuset på to forforskellige steder, anbringer præparatet 24 timer i klorpalladium (0.001%) eller overosmiumsyre (0.2% til mindre — 0.5–1% til større præparater), 24 timer i absolut alkohol. Herefter indlejring i frisk rygmarv eller hjerne, hærdning i alkohol og skæring. Man kan før indlejringen fylde hulrum og kanaler med limglycerin eller olie-voks, men dette mente forfatteren var unødvendigt, medmindre man ville holde organon *Corti* på plads.

Gottstein og *Nuel* (1872) anvendte praktisk talt den samme teknik, idet *Gottstein* dog omtalte afkalkning med ¼–1% kromsyre eller 0.1% klorpalladium tilsat 1/10 saltsyre. Ligesom foregående forfatter fandt *Gottstein* ingen anledning til at indhælde glycerin-lim.

Moseley (1872) studerede de finere strukturer i frisk tilstand i jodserum eller osmiumsyre og anså marsvin som bedst egnede til disse formål. Mindre dele af organen *Corti* anbefalede han fjernet med fine skalpeller eller sakse og undersøgt i glycerin. Ved undersøgelse af hele sneglen anvendtes store kvanta kromsyre (½%) i ca. 14 dage. Den afkalkende effekt skulle skyldes svovlsyre! Forfatteren fandt kromsyre bedst, også i forhold til saltsyre. Ved fremstilling af længdesnit anbefaledes fyldning af hulrummene med lige dele voks og kakaosmør med samtidig fjernelse af luften under luftpumpe. Henviste ellers til *Waldeyrs* og *Boettchers* metodik.

Retzius (1872) anvendte i udstrakt grad udpræparation. Som fixationsmiddel anvendtes væsentligst Müllers vædske. Til farvningerne anvendtes sølvklorid, guldklorid, rosanilin og injektioner af berlinerblåt.

Pritchard anførte i sit arbejde fra samme år, hvor mange præparater han ødelagde, inden han lærte teknikken nogenlunde. Han anbefalede to fremgangsmåder: 1) Frisk undersøgelse af ufarvede væv eller væv farvede med karmin eller anilinblåt. Bedst egnede var cochleae fra nyfødte dyr, f. eks. kyllinger.

2) Til nøjere undersøgelse var det nødvendigt at hærde, blødgøre og skære. Hærdningen foretoges med ¼–½% kromsyre. Afkalkningen voldte størst vanskelighed, og forfatteren ødelagde mange præparater, før den rette styrke af syren fandtes. Der kunne anvendes salpeter- eller saltsyre. Førstnævnte blev foretrukket i en styrke af ½–1%.

Skæring foretoges med en meget skarp barberkniv eller med *Stirlings* maskine. Farvningen foretoges med karmin eller guld.

Hensen (1873) refererede *Boettchers* metoder, og mente iøvrigt, at man kunne undgå afkalkning ved at fjerne knoglerne med en kniv uden at lædere de hindede dele.

Kuhn (1877) anbragte det spaltede hovede fra det nyligt dræbte dyr i flere

timer i $^1/_8$% kromsyre, hvorefter den hindede labyrinth som helhed udpræpareredes. Indlejring i rygmarv. Farvning med pikrokarmin og hæmatoxylin.

Schwartze (1878) anvendte fixation i Müllers vædske, blotlæggelse af den hindede snegl, forsigtig fjernelse af denne med præparernåle, anbringelse i 1% saltopløsning, humor aquaeus eller 0.1–1% osmiumsyre med påfølgende mikroskopisk undersøgelse.

Flesch (1879) anvendte som konserveringsmiddel en blanding af kromsyre, osmiumsyre og destilleret vand (0.10 — 0.25 — 100.00). Til fuldstændig afkalkning af isolerede tindingeben fra unge mus anvendtes ¼–½% kromsyre med påfølgende udvaskning i spiritus.

I *Retzius'* omfattende og rigt illustrerede undersøgelser over øret hos hvirveldyr (1881) og mennesket (1882) står der desværre ikke meget om teknik, omend man til dels kan læse sig til denne i billedteksten. Der er væsentligst arbejdet med fostre og nyfødte dyr, og afkalkning er så vidt muligt undgået.

Disse arbejder viste tydeligt, hvor tålmodig og omhyggelig man med datidens hjælpemidler måtte være for at få resultat af sine undersøgelser. Således angiver *Retzius*, hvorledes han hos voksne dyr og mennesket forsigtigt skrabede labyrinthkapslen væk. Hver gang, der blev åbnet for et nyt afsnit af den hindede labyrinth, anbragtes hele præparatet i ½ time i fixationsvædsken (¼–¾% osmiumsyre), hvorefter der atter blev arbejdet videre, og så fremdeles. Ved farvningerne blev der i udstrakt grad anvendt forgyldning og forsølvning, men desuden karminglycerin og fuksin.

Ranvier (1888) fremhævede i: »Technisches Lehrbuch der Histologie« betydningen af *Reissners* opdagelse af den membran, der er opkaldt efter ham, i forbindelse med *Reissners* redegørelse for de forskellige labyrinthafsnits kommunikationsforhold.

Dernæst omtalte *Ranvier*, at man ved undersøgelsen af det *Cortiske* organ, dets forbindelser og anordningen af sneglekanalen må anvende axiale snit. Da sneglen hos marsvin springer ind i trommehulen er dette dyr bedst egnet til undersøgelser af denne art. Til afkalkning anbefaledes kromsyre, pikrinsyre og myresyre, hvor sidstnævnte tilsyneladende er nævnt for første gang i litteraturen.

Myresyren anvendtes i forbindelse med guldklorid på følgende vis: En isoleret snegl fra marsvin anbragtes i 1–2 cc. 1% guldklorid. Hertil sattes myresyre i forholdet 1 til 4, hvorefter hele blandingen opvarmedes til syden. Hensigten med denne fremgangsmåde var at opnå præliminær fixation ved hjælp af guldkloridet og påfølgende afkalkning med myresyren. Den kulsyre, som udvikledes under afkalkningen, undveg gennem forskellige åbninger i sneglekanalen. Afkalkningen var imidlertid ikke fuldstændig, hvorfor præparatet yderligere anbragtes i vandig, mættet pikrinsyre.

Der anvendtes også fixation med osmiumsyre (7 promille natriumkloridopløsning indeholdende 1:500 osmiumsyre), hvori sneglen anbragtes under dannelse af åbninger i labyrinthkapslen (foregik under glasplade af hensyn til osmiumsyredampene). Efter ophold på 10–12 timer heri foregik afkalkningen med 500 cc. 2 promille kromsyreopløsning. Afkalkningen foregik meget langsomt og hindrede dog ikke udrivninger af membrana *Reissneri*. Skæring foregik på fri hånd eller ved hjælp af en slags mikrotom bestående af et metalrør, hvortil præparatet var

fixeret. Metalrøret kunne ved hjælp af en skrue i bunden hæves. I forbindelse med metalrøret var anbragt en barberkniv, der kunne skære vinkelret på metalrørets retning. Iøvrigt anvendte forfatteren i udstrakt grad plukkepræparater.

Den berømte wienerørelæge, *Adam Politzer* (1889), var den første, som gav en fyldig og efter datidens forhold udtømmende beskrivelse af høreapparatets histologiske teknik. I sin indledning fremhævede han vigtigheden af, at man anvendte de forskellige teknisk-histologiske landvindinger. Han karakteriserede den tidligere anvendte mikroskopiske teknik på labyrinthens område for ufuldkommen og udtalte, at der først i de sidste år, især ved fuldkommengørelse af afkalknings- og indlejringsmetoder, var sket væsentlige fremskridt for den videre udvikling af den normale og pathologiske labyrinthhistologi.

Fixationsmetoderne er i korthed omtalt under indledningen til afkalkning. Til fixation er anvendt kromsyre og dennes salte, blandinger af kaliumbikromat og osmiumsyre *(Tafanis* blanding), kromsyrealkohol, kromsyre og osmiumsyre, 3% salpetersyre *(Altmann)* og impregnering med metalsalte (guld- og osmiumbehandling).

Afkalkning inddeltes i skånende, længere varende metoder og den hurtige afkalkning.

For at få skåret labyrinthen sådan, at alle dele holdt deres plads, var det nødvendigt at fylde hulrummene med en substans, som kunne stivne og skæres. Her opremser *Politzer* midler, der har været anvendt til dette formål: Gummi-lim, glycerin-lim, paraffin, olievoks og hønseæggehvide. Alle disse midler havde kun underordnet værdi i oto-histologien, efter at vi gennem *Schiefferdecker* og *Duval* lærte celloidin at kende.

Den histologiske undersøgelse af labyrinthen er specielt omtalt i et mindre afsnit. Det fremgår heraf tydeligt, at man fremdeles var yderst forsigtig ved præparation af labyrinthen.

Præparatet anbragtes i frisk tilstand i ½% osmiumsyreopløsning i 10 timer. Så tilsattes det 4-dobbelte kvantum af følgende vædske: Eddikesyre 1%, kromsyre ½%, der fornyedes efter 3–4 dage, for atter at lade præparatet ligge yderligere 4 dage. Derefter afkalkedes i 3–5% salpetersyre. Efter fuldstændig afkalkning, indlejredes i celloidin.

Regelret fixering af vævselementerne, langsom og forsigtig afkalkning og fuldstændig fyldning af labyrinthhulrummene med celloidin dannede hovedbetingelserne for fremstillingen af vellykkede labyrinthpræparater.

Af farvemetoder anførtes forskellige karminer, eosin og den i *Friedländers* »Mikroskopische Technik« angivne hæmatoxylin-alun. Den første og sidste kunne farve afkalket væv.

Katz (1893) anbefalede til studiet af tindingeben at gøre labyrinthen gennemsigtig og herved anskueliggøre de forskellige bestanddele. Metodikken var følgende: Labyrinthen udpræpareredes forsigtigt i 15% salpetersyre, som både fixerede og virkede afkalkende. Efter 24 timer sattes til opløsningen ¼ salpetersyre, hvorved labyrinthen macereredes, uden at de fixerede, membranøse dele ødelagdes særligt. Efter 1 time i vand anbragtes den i glycerin, hvorved præparatet i løbet af to timer blev ganske gennemsigtigt. Det *Cortiske* organ var godt bevaret i dets enkeltheder, selv om cellerne var noget skrumpede.

Eschweiler (1899) hærdede i stigende styrker alkohol og afkalkede i 4 dele salpetersyre (vgtf. 1.33) i 100 dele destilleret vand. Efter afkalkningen udvaskedes i rindende vand i 24 timer.

I *Krauses* »Encyklopädie der mikroskopischen Technik« Gehörorgan 1903) omtaltes først vanskelighederne ved den tekniske præparation af labyrinther. *Krause* frarådede åbning af labyrinthen, idet man herved fremkaldte læsioner af de membranøse dele. I stedet anbefaledes for første gang til histologisk præparation af indre øre intravital fixation. Derefter foretoges udpræparation af tindingebenet, som efterfixeredes et stykke tid.

Af fixativer anbefaledes blandinger af kromsyre og osmiumsyre, eventuelt med tilsætning af eddikesyre. Til intravital gennemskylning anbefaledes i særlig grad *Zenkers* vædske.

Under afkalkning omtaltes først midler, som havde været anbefalet til afkalkning af labyrinther (0.5% kromsyre, koncentreret pikrinsyre, 3.5% salpetersyre, salpetersyre-alkohol, floroglucin-saltsyre, palladiumklorid-saltsyre og mange andre). Derefter fremhævedes egen anvendelse af trikloreddikesyre i vandig 3–5% opløsning. Den angaves at være meget skånende, tillod fuldstændig afkalkning af marsvinelabyrinthen på 2–3 dage og tillod alle farvninger. Det anførtes dog, at det ved undersøgelse af nerverne i labyrinthen (med Golgi- og methylenblåtmetoden) var bedst at undgå afkalkning.

Bøhm & v. Davidoff (1903) henviste under afsnittet høreorganet væsentligst til *Ranviers* og *Retzius'* præparationsmetoder, men angav derudover selv at have anvendt Müllers vædske til afkalkning af udpræparerede labyrinther, først 2 dage ved stuetemperatur og derefter 3 uger i termostat. Til nerveundersøgelser anvendtes yngre fostre eller embryoner og farvning efter *Golgi* eller *Ramon y Cajals* metoder.

Een af de forskere, der har betydet allermest for labyrinthhistologiens nuværende stade er *Wittmaack*. Fra hans hånd foreligger et par ret enslydende arbejder fra 1904 og 1906, indeholdende resultaterne af undersøgelser over enhedsfixation, hvorved der toges behørigt hensyn til alle de i labyrinthen forekommende vævsformer, specielt til nervevæv. Disse arbejder fremhæves overfor mange andre arbejder fra *Wittmaacks* hånd, idet de her omtalte fixations-, afkalknings- og farvemetoder med små afvigelser er de samme, som *Wittmaack* har brugt under sine talrige undersøgelser over labyrinther. Arbejderne fremhæves også, fordi *Wittmaacks* metoder fremdeles anvendes af labyrinthforskere.

Osmiumfixeringen fandt forfatteren utilfredsstillende, fordi osmium farvede knoglevævet for stærkt. Selv anvendte *Wittmaack* en opløsning af Müllers vædske, hvortil der sattes formalin (10%) og iseddike (3.5%). Heri skulle tindingebenene blive liggende, indtil vædsken fik en dyb mørkegrøn farve. For at fremskynde fixationen anvendtes en overgang anbringelse af præparaterne i en varmeovn. Til at begynde med foretoges udpræparation af sneglevindingen med akustikusstammen. Denne anbragtes derefter i nogle dage i salpetersyre (2–3%), tilsat formalin. Der udvaskedes på sædvanlig måde i vand og indlejredes i paraffin eller celloidin. Forfatteren foretrak i almindelighed celloidin. Senere foretoges afkalkning på hele tindingebenet, uden forudgående udpræparation af sneglen, med en 5–10% salpetersyre-formolopløsning. *Wittmaack* anså fixationen for det vigtigste i præpa-

rationen og blev stående ved en fixationsvædske med følgende sammensætning: 5% kaliumbikromat med tilsætning af 10% formol og 3% iseddike, bedre kendt under navnet Kaformacet. Efter denne forbehandling lykkedes en række farvemetoder: Hæmatoxylin-eosin, van Gieson-farvningen, safranin, farvningen af nervecellerne med polykromt metylenblåt, thionin eller toluidinblåt samt *Kultschitzky-Wolters* metode til marvskeder. Dog tilføjedes, at disse sidste nervecellefarvninger i almindelighed ikke gav bedre resultater end de almindelige oversigtsfarvninger, og ydermere ofte gav anledning til fejlslutninger.

Yoshii (1909) har i sine experimentelle støjundersøgelser anvendt den samme histologiske teknik som *Wittmaack*. Desuden har han konsekvent anvendt intravital fixation.

Hoessli (1912) anvendte samme fixering, præparation og farvning som *Yoshii* og udtalte, at man på grund af indlejringen i celloidin ikke kunne farve med typiske Nissl-farver!

Arbejder fra de følgende år (*Manasse* (1917), *Möbius* (1926), *Takezawa* (1934) og *Saxén* (1939) indeholder en teknik, som væsentligst er baseret på *Wittmaacks* arbejder. Dog har *Saxén* for at kunne anvende så mange farvningsmetoder som muligt anvendt fixation med Kaformacet, Susa, 10% formalin og Zenker-formalin. Ved afkalkningen anvendte *Saxén* den af *Ziegler* anbefalede svovlsyrling med tilsætning af 10% formalin. Hensigten med at anvende svovlsyrling var, at dette stof på grund af sin flygtighed i højere grad end de andre afkalkningsmidler kunne bringes til at forsvinde ved afsyringen. Desuden mente forfatteren at have iagttaget, at de endocellulære strukturer bedre bevarede deres affinitet overfor forskellige farvestoffer. Trikloreddikesyre var så god som svovlsyrling, men anvendtes ikke meget på grund af den relativt høje pris. Af farvemetoder anvendte *Saxén Weigerts* jernhæmatoxylin, *Hansens* trijernhæmatein og *Mallorys* fosforwolframhæmatoxylin, hvoraf de førstnævnte i udstrakt grad anvendtes til Nissl-farvning. Som parallelmetoder anvendtes *Manns* metylblå-eosinfarvning og *Dominicis* orange-eosin-toluidinblåt. Til farvning af Golgiapparatet anvendtes nilsulfatblåt. Metoden var dog ikke særlig god på grund af for svag kontrast. Til netapparatet anvendtes impregnation efter *Altmann-Kulls* metode ved hjælp af syrefuksin-toluidinblåt-aurantia. Endelig anvendtes et par sølvmetoder, som senere vil blive omtalt nærmere. Iøvrigt pointerede *Saxén* i lighed med *Werner* vigtigheden af at holde fixationsvædske, temperatur samt fixationstid konstant, idet alle tre forhold er i stand til at give variationer i det histologiske billede.

Krauses »Enzyklopädie der mikroskopischen Technik« fra 1926 er kun et optryk af udgaven fra 1903, udover enkelte ændringer i typografien.

Covell (1936 og -38) har beskæftiget sig en del med cytologiske studier af labyrinthen, især hårcellernes skæbne under forskellige betingelser. I den anledning udtalte han i sit første arbejde, at de langvarige og møjsommelige metoder til at demonstrere pathologiske forandringer i cochlea ofte tilslører finere forandringer, især i hårcellernes mitochondrier. Forfatteren fandt det nødvendigt at udelukke afkalkningen. *Covell* narkotiserede dyrene, gennemskyllede med varmt fysiologisk saltvand og fixerede ved gennemskylning med 10% formalin. *Covell* fandt, at man ved hjælp af mitochondriefixativer, f. eks. *Regauds* vædske, var i stand til at afkalke tilstrækkeligt til at tillade at skære cochlea indlejret i paraffinblok. Det

tilføjedes dog, at det undertiden var umuligt at få komplette snit til orientering af de forskellige strukturer i ductus cochlearis. Afkalkningen i Regauds vædske (formol-kaliumbikromat-vand) foregik i 3 dage med daglig skiften. Forfatteren hævdede, at dyr, der blev gennemskylningsfixerede, afkalkede, skåret og farvet på sædvanlig vis, ikke gav nye oplysninger.

I arbejdet fra 1938 anbefaledes decapitation af dyrene, fridissekeren af tindingebenene, åbning af bulla og fjernelse af cochlea, hvorefter yderligere fridissektion af organon Corti foretoges i varm fysiologisk saltvand under specielt dissektionsmikroskop. I sidste arbejde arbejdedes med farvning med metylenblåtopløsning 1:5000. I første arbejde med anilin-syrefuksin og metylgrønt til mitochondriefarvning (uden forudgående afkalkning eller højst afkalkning med *Regauds* vædske).

Hamberger & Hyden (1945) dræbte dyrene (marsvin) ved decapitation, blottede det indre øre og fjernede cochlea på begge sider med stor forsigtighed. De fixerede i Carnoys vædske i 1½ time med påfølgende afkalkning i 20% eddikesyre, som var 0.05 m med hensyn til lanthanacetat. Denne specielle fremgangsmåde tilfredsstillede alle fordringer til den cytokemiske metode, som bestod i ultraviolette absorptionsmålinger på ganglion spirale, efter at dyrene var trættede med toner af forskellig styrke og frekvens. Lanthanacetatet skulle bevirke en udfældning af nukleinsyrekomponenter under den påfølgende afkalkning med bibeholdelse af de cellulære strukturer. Farvbarheden er ikke undersøgt.

Iøvrigt udtaler forfatterne, at den af *Wittmaack* angivne metode i cytologisk henseende giver meget usikre resultater, hvad angår gangliecellerne, idet disse ofte skrumper ved behandlingen. Yderligere giver den langvarige fixation i forbindelse med den påfølgende behandling med basiske anilin-farvestoffer usikre resultater med hensyn til Nissl-farvningen.

Af større samlearbejder om ørets histologiske teknik findes der fra dette århundrede kun to: *Alexander & Fischer* (1925): »Präparationstechnik des Gehörorgans« og *Cl. F. Werner:* »Das Labyrinth« (1940).

Alexander & Fischers bog er i virkeligheden en fortsættelse af *Politzers* og indeholder ligesom denne et afsnit om ørets makroteknik og eet om ørets mikroteknik. I sidstnævnte er indbefattet undersøgelse af friske væv, fixation, hærdning, afkalkning, udvanding, indlejring og farvemetoder. Afsnittet om undersøgelse af friske væv er en rekapitulation af ældre undersøgelsesmetoder. Plukkepræparationen omtales og endelig omtales macerationen.

Under fixation omtales et utal af fixationsmidler, blandt andet de forskellige modifikationer af kaliumbikromatholdige opløsninger, Wittmaacks vædske, Susa (eller Haidenhains vædske), salpetersure, pikrinsure samt alkoholiske fixationsmidler. Til menneskeøret anbefaledes formalinblandinger og til dyreundersøgelser *Kolmers* og *Retzius* metoder (omtalt side 95 i bogen).

Om afkalkning udtales, at denne må foregå så skånsomt som muligt, og at den må afbrydes, når endepunktet er nået, idet for langt ophold selv i svag syre influerer uheldigt på vævene. For at forebygge dette må man prøve vævets hårdhed med en poleret nål eller følge afkalkningens forløb og fuldendelse ved hjælp af røntgenskærmen. Iøvrigt anbefales efter *Schaffers* forsøg vandig opløsning af 5% salpetersyre. Om andre syrer udtales, at saltsyre ødelægger kromatinet og derved farv-

barheden, trikloreddikesyren bevirker en mere eller mindre udtalt opsvulmen af vævet. Svovlsyre fremkalder udfældninger i objektet.

Afkalkningsvædskerne skal anvendes i mindst det tidobbelte volumen. Anvendelsen af *Thomas* vandhjul finder forfatterne overflødig, ja, endog skadelig.

Herefter følger en opremsning af tidligere refererede afkalkningsmetoder. *Zolovtzoff* fjerner alt knoglevæv og undgår således afkalkning for at kunne farve nervetrådene i det *Cortiske* organ. Floroglucinblandingerne angives som definitivt ødelæggende for den senere farvning. Myresyren anbefales fremdeles koncentreret efter *Schaffer*.

Under indlejring står først omtalt celloidinindlejringen, indført af *Duval* og *Schiefferdecker* (1878 og 1880). Herefter følger en beskrivelse af indlejringsteknikken.

Derefter omtaltes den af *Klebs* (1869) indførte paraffinindlejring, der ikke tidligere havde været anvendt til indlejring af knogleholdige objekter, bortset fra *Alagna*, der anvendte den til øret på små gnavere og *J. Fischer*, som af og til anvendte metoden for at få tyndere snit.

Endelig omtaltes kombinationen af disse to metoder: Celloidinparaffin indlejring, hvor man benyttede sig af celloidinens større modstandsdygtighed i forbindelse med den ringere tykkelse af paraffinsnittene.

Det pointeredes, at undersøgeren selv burde skære sine præparater, idet man allerede under skæringen kunne se forandringer, som det færdige snit ikke tillod een at se.

Under farvning omtaltes forudsætningen for denne og dennes betydning. Der nævnedes forskellige typer på farvninger: Progressive farvninger, hvor vævet kun tager imod en vis farvning, selv om det bliver liggende i farveopløsningen, og regressive farvemetoder, hvor man efter farvningen fjerner farvestoffet fra de strukturer, hvortil farvestoffet har mindst affinitet. Der omtaltes substantive og adjektive farvninger, hvor førstnævnte er en indvirkning af farvestoffet på vævet, medens den anden kun kunne finde sted efter forudgående bejdsning. Efter den forskellige affinitet til enkelte cellebestanddele skelnes mellem kerne-protoplasmafarvning og kombineret farvning. Kernefarvningen foregår som regel med basiske, protoplasmafarvningen med sure farvestoffer.

Det omtales, at enkelte farver bliver kraftigere, andre svagere med alderen, hvorfor man ved serieundersøgelser bør foretage prøver på farvekraften inden anvendelsen. Det foretrækkes at anvende fortyndede opløsninger i længere tid fremfor koncentrerede opløsninger i kortere tid.

Af kernefarvninger nævnes og beskrives: *Delafields*, *Ehrlichs*, *Mayers*, *Böhmers*, *Haidenhains*, *Hansens*, *Weigerts*, *Bendas* og *Helds* hæmatoxyliner. Desuden omtaltes forskellige former for karminfarvninger: Alunkarmin, lithionkarmin, saltsurt karmin og parakarmin.

Af basiske tjærefarvestoffer omtaltes thionin som et godt kernefarvningsmiddel og toluidinblåt i svag vandig opløsning som et godt farvemiddel med lignende farveegenskaber som det foregående, anvendeligt til farvning af nerver, ganglieceller, tigroidsubstans, fibriller og slim.

Ved plasmafarvningen kommer overvejende de sure anilinfarver med større affinitet til protoplasma og intercellularsubstans i betragtning. De anvendes oftest

i forbindelse med en kernefarvning for at fremstille et kontrastrigt præparat. Der nævnes eosin, erythrosin, orange og syrefuksin, som alle anvendes i fortyndet form.

Ved samtlige disse metoder er der intet udtalt om anvendelsesmuligheden, efter at vævene har været udsat for afkalkning. Derimod indledes afsnittet om metalimpregnationer med, at sådanne ikke kan finde sted, hvis der har været foretaget afkalkning. Man anvender helst nyfødte dyr eller fostre. Metalimpregnationerne anvendes for at fremstille de nervøse endeapparater, almindeligst med sølvnitrat. Der beskrives 4 metoder: *Bielschowsky*, *Ramon y Cajal*, *Golgi* og *Lenhossek*. Til fremstilling af netapparatet omtales *Ramon y Cajals* metode med fixation i urannitrat og *da Fanos* metode med fixation i koboltnitrat.

Bogen afsluttes med et udmærket afsnit om kunstprodukter i det histologiske præparat. Især arteficielle forandringer i membranerne gøres til genstand for omtale.

Cl. F. Werners meget omfattende bog fra 1940 udmærker sig ved at bringe en samlet oversigt over utallige dyreexperimenter sammenholdt med histologiske undersøgelser.

Bogen indeholder også et kapitel om histologiske metoder anvendt på labyrinthen, samt et kapitel om postmortale og artificielle forandringer.

Werner udtaler, at man i de histologiske metoder må bestræbe sig for at undgå postmortale og artificielle forandringer. På den anden side forudsætter en sådan fuldkommengørelse af teknikken to mod hinanden stridende udviklinger: En videre differentiering af metoderne samtidig med ensartethed ved gennemførelsen af de enkelte metoder. I det hele taget efterlyses ensartede arbejdsmetoder for at undgå misforståelser, og for at arbejder fra forskellige forfattere kan sammenlignes. Idealet er et afgrænset antal standardiserede metoder med nøje kendt ydeevne og fejlgrænse.

Under de histologiske metoder er det i særlig grad fixationen, der har haft *Werners* interesse. Under forsøg på at finde en exact fixationsteknik har han gennemprøvet talrige fixationsopløsninger. Der er foretaget kontinuerlige undersøgelser af pH og frysepunktssænkning samt undersøgelser over fixationens indflydelse på det histologiske billede. Efter disse undersøgelser anbefaler *Werner* Kaformacet som det bedste blandt 20 forskellige fixationsmidler anvendt på frølabyrinther. Dog anbefales også *Susa* og *Zenker*. Ved egne undersøgelser har forfatteren vist betydningen af, at man ved fixation af homoiotherne dyr (pattedyr og fugle) anvender fixationsvædske af legemstemperatur. Fixationstiden bør være konstant, idet varierende fixationstid kan give varierende billeder.

Endelig omtales den intravitale fixation kontra den almindeligste fixation med anbringelse af den isolerede labyrinth i fixationsvædsken. Gennemskylningsfixationen anføres at være den anden form for fixation langt overlegen, under forudsætning af rigtig udførelse. Den øvrige del af den histologiske teknik er ikke udførligt omtalt og består væsentligst i extrakt af erfaringerne fra andre forfatteres arbejder.

Under indlejringsmetoder omtales celloidin som det vigtigste indlejringsmiddel, desuden paraffin, der har den fordel at tillade tyndere snit på kortere tid, og endelig paraffin-celloidinmetoden (*v. Fieandt & Saxén*).

Afkalkningen er spartansk omtalt. Til at begynde med nævnes, at syreholdige

fixationsvædsker kan afkalke noget, men som regel må der en efterafkalkning til. Hertil anbefales 5% salpetersyre med tilsætning af 5–10% formalin. I stedet for dette har *Hagens* (1940) anbefalet en alkoholisk opløsning af salpetersyre. Præparatet skal være ophængt eller anbragt på glasuld, således at kalksaltene kan synke til bunds. Afkalkningens slutpunkt findes ved en kalilud- eller sodaprøve.

Efter afkalkningen anbringes præparaterne inden udvandingen i 2½% lithium- eller natriumsulfat.

Angående farvemetoder henvises til *Romeis'* og *Schmorls* tekniske håndbøger, til *Alexander & Fischers* bog og til *Eckert-Möbius'* afsnit i *Denker & Kahlers* »Handbuch der Ohrenheilkunde«. Til oversigtsfarvninger anbefales den i årevis holdbare dobbeltfarvning med hæmatoxylin-eosin, idet det fremhæves, at jo længere kromering des skarpere billeder. Det lykkes også efter kort fixationstid at få pæne billeder med Delafields hæmatoxylin.

Nerveelementerne forlanger specielle metoder, selv om man i oversigtspræparaterne kan anskueliggøre disse ret godt. Her fremhæves *Wittmaacks* metoder med thionin til Nissl-substansen og den sekundære osmiering til fremstilling af marvskederne. Til fremstilling af axecylindrene skal afkalkning helst undgås af hensyn til den påfølgende sølvimpregnation. På den anden side anføres *Saxéns* arbejde, hvor det efter afkalkning er lykkedes at få pæne præparater. *Tanaka* har anbefalet at udpræparere modiolus ved studier af ganglion spirale og sneglenerverne. Her er en afkalkning ganske vist nødvendig, men varer kun få timer.

Det er lykkedes *v. Fieandt & Saxén* (1936) at fremstille Golginet ved hjælp af nilsulfatblåt på hunde og ved hjælp af *Bielschowsky-Maresch's* metode hos mennesker.

Plastosomer er fremstillet af *Iwasa*, *Goto*, *Alagna* og *Covell* med afvigende metoder og varierende resultater.

Iwasa og *Goto* har anvendt præparater fremstillede med jernhæmatoxylin, hvorved der som bekendt fremkommer præparater, hvor man kan se for meget. *Alagna* og *Covell* har arbejdet med en modificeret *Altmann-Kull* metode.

KAPITEL V

EGNE LABYRINTHUNDERSØGELSER

A. Fixation

De to former for fixation, der kan være tale om, er beskrevet på siderne 49–50, hvorfor jeg kun vil ridse ulemper og fordele ved de to metoder op.

Den postmortelle fixation er almindeligt anvendt ved de fleste histologiske undersøgelser, hvor vævene fixeres efter at være taget ud af deres sammenhæng med det levende individ. Der opstår herved mulighed for postmortelle, autolytiske forandringer i det yderst følsomme indre øre (i særdeleshed det Cortiske organ). Dette viser sig som udfældninger i de endo- og perilymfatiske rum og desuden defiguration af cellerne, specielt i det Cortiske organ, afhængig af hvor længe de autolytiske forandringer har haft lejlighed til at gøre sig gældende, inden fixationsvædskerne standsede vitale processer samt processer af autolytisk natur.

Selv om de autolytiske forandringer ikke når så vidt, vil der kunne ses nogen udflyden af vævselementerne i form af uskarpe celle- og kernegrænser. Det ejendommelige forhold, at postmortelt kaformacetfixerede kontrolpræparater lader sig farve stærkere med hæmatoxylin end intravitalt kaformacetfixerede kontrolpræparater er tidligere omtalt. Det kan forklares ved mindre god kromering af de postmortelt fixerede præparater, idet jo bedre præparatet er kromeret (fixeret), des mindre vil det tage imod hæmatoxyliner. Forskellen i farveintensitet forsvinder nemlig ved afkromering af de intravitalt kaformacetfixerede præparater a. m. *Tsiminaki* (se *Romeis*). Efter denne procedure er de intravitalt fixerede præparater de postmortelt fixerede præparater overlegne fra farvningens side og i morfologisk henseende. Forskellen forsvinder også efter decalcinering, således at de forskellige syrer øjensynligt har en afkromerende effekt.

Fordelene ved den postmortelle metode ligger i, at den er simpel i anvendelse, hvorfor mindre øvede har en noget større mulighed for at fixere mere ensartet, dog kun, hvis den tid, der går fra dyret dræbes til hovedet med de åbnede bullae tympanicae anbringes i fixationsvædsken, kan holdes konstant.

Når man behersker den intravitale gennemskylningsteknik, er fordelene indlysende.

Teknikken er beskrevet i detailler side 50 og volder med nogen øvelse ikke større vanskelighed.

Imidlertid er ikke alle fixationsvædsker lige egnede til formålet. Der foretoges derfor en undersøgelse over resultatet ved gennemskylningsfixation på 12 marsvin med 6 forskellige fixationsvædsker (hver på to dyr). (Fixationsforsøget 12. 11. 47).

Der blev anvendt dyr af ca. samme alder og vægt (4–5 måneder gamle, vægt ca. 400 g), for at undgå forskelle som følge af alder ved afkalkningen.

Der blev anvendt følgende fixationsvædsker:

10% vandig formalin med pH på 3.4
Kaformisal med pH på 3.5
Kaformacet med pH på 3.0
Susa med pH på 1.05
Sublimatalkohol med pH på 5.4
Carnoy med pH på 1.8
(angående sammensætning se forsøgsprotokollen).

Det ses, at surhedsgraden er højst varierende. Susa har den laveste pH, hvilket skyldes det ret store indhold af trikloreddikesyre. Denne fixationsvædske har mulighed for at virke afkalkende, og man skulle på forhånd tro, at den var særligt egnet ved undersøgelser, hvor der skal foretages afkalkning. pH af vædsken er imidlertid så lav, at der, så længe fixationen står på, er mulighed for, at kernefarvbarheden beskadiges. Dette er sikkert årsagen til det mere udflydende billede i susa-præparaterne sammenlignet med forholdet i kaformacet-præparaterne. I det hele taget kan det ikke være en fordel at arbejde med fixationsvædsker med en pH væsentligt lavere end pH for den anvendte afkalkningsvædske (for myresyreformiatblandingen 2.2).

Carnoys vædske har den næstlaveste pH af de 6 vædsker og skulle også besidde en vis afkalkende effekt. Det har den imidlertid ikke, svarende til, hvad der er fundet under de systematiske forsøg med alkoholiske syrer.

Formalin, Kaformacet og Kaformisal har omtrent samme brintionkoncentration, så længe de er frisk fremstillede, men da pH i de to sidstnævnte vædsker snarere stiger noget under fixationen, skulle ingen af de tre vædsker på forhånd frembyde ulemper i henseende til farveresultater.

Sublimatalkohol nærmer sig stærkt neutralpunktet og må derfor klassificeres med de tre sidstnævnte fixationsmidler.

Forløbet er vellykket i samtlige 12 fixationsforsøg, og det er værd at lægge mærke til, at leveren i samtlige dyr fixeres hurtigt og effektivt til trods for, at leveren er indskudt i portåresystemet, hvorved den bortset fra de små å. hepaticae propriae først modtager fixationsvædskerne, efter at disse har været igennem tarmsystemet.

Fixationen med Carnoys vædske forløb uhyre hurtigt, idet begge dyr i løbet af mindre end 10 sekunder blev fuldstændigt stive.

Nyrerne fjernedes til kontrol af fixationen. Hovederne fjernedes og bullae tympanicae åbnedes, hvorefter hovederne sammen med de udtagne nyrer anbragtes til efterfixation i de samme vædsker, som anvendtes til fixationsgennemskylningen, i 1 døgn.

Herunder er det værd at lægge mærke til farveforholdene i de forskellige præparater:

Formolpræparaterne bliver nærmest gråblege.
Kaformacetpræparaterne bliver mørkt græsgrønne.
Kaformisalpræparaterne bliver lyst græsgrønne.

Susapræparaterne bliver kridhvide.
Sublimatalkoholpræparaterne bliver blege, lignende formolpræparaterne.
Carnoypræparaterne bliver tilsyneladende noget opsvulmede og slimagtige.

Det viser sig nemlig ved den senere undersøgelse af fixationens anvendelighed, at der er et vist sammenhæng mellem denne og præparaternes farve ved efterfixationen, idet de stærkest farvede altid bliver de bedste. Dette hænger måske sammen med, at den stærkere farvning er et udtryk for, at de virksomme bestanddele i fixationsvædskerne i disse kraftigt farvede præparater findes mere koncentreret end i de blege præparater. Denne hypotese synes i alle tilfælde at gælde for Kaformacet kontra Kaformisal og for Susa kontra sublimatalkohol, sådan som det fremgår af næste afsnit.

B. Vurdering af fixationen:

Ved vurdering af fixationsgraden ved den intravitale gennemskylningsfixation (12. 11. 47) er der anvendt beskrivelse af de udtagne nyrer, som ikke har været underkastet en senere afkalkning. Desuden er der anvendt beskrivelse af de tilsvarende labyrinther efter afkalkning. Da afkalkningen er den samme for alle 2×6 labyrinther, bliver den eneste forskel fixationen. Disse undersøgelser er foretaget i amplitudemikroskop. Men desuden er der ved anvendt fasekontrastmikrofotografering af ganglion spirale

En delvis beskrivelse af resultatet af nyrekontrolforsøgene har allerede fundet sted under vurderingen af fixation i tilslutning til modelforsøgene. En mere detailleret beskrivelse er her på sin plads for at kunne sammenligne resultaterne fra nyrekontrolforsøgene med resultaterne fra labyrinthgennemskylningsforsøgene. Der skulle helst være nogenlunde overensstemmelse mellem fundene.

1. Nyrepræparaterne er farvede med *Bøhmers* hæmatoxylin, *Weigerts* hæmatoxylin og *Einarsons* gallocyanin.

Ved farvning med gallocyanin fandtes kernetegningen i tubuli contorti og i glomeruli mest intens i sublimatalkohol præparaterne, mindre intens i formolpræparaterne og Carnoy-præparaterne, medens susa-, kaformisal- og kaformacetpræparaterne var forholdsvis svagt tegnede.

Ved farvning med *Bøhmers* hæmatoxylin fandtes cellekonturerne bedst formede i susa- og kaformacetpræparaterne, medens de var noget udviskede i kaformisalpræparaterne. I formolpræparaterne er der betydelig skrumpning af samtlige vævselementer med små glomeruli og tilsvarende ret store kapselrum. Der fandtes en udtalt opblødning og udviskning af de luminale konturer i tubuli contorti med tab af børstesømmen flere steder. På samme måde forholdt Carnoy-præparaterne og de sublimatalkoholfixerede præparater sig.

Hvad kernefarvningen angår, var forholdet det stik mosatte, idet der ved fixation med Susa, Kaformisal og Kaformicet fandtes svagere kernefarvning, medens kernefarvningen efter fixation med de øvrige vædsker var forbavsende kraftig, måske forårsaget af kernekondensation som følge af skrumpningen.

Forøvrigt sås efter fixation med de sidste tre vædsker betydelig protoplasmatisk medfarvning, muligvis også en følge af mindre god fixation.

Ved *Weigert*-farvning fandtes samme forhold som ved *Bøhmer*-farvning, idet

kernefarvningen var mindst udtalt, men vævet bedst fixeret i Kaformacet, Susa og Kaformisal, medens kernefarvningen var mest distinkt i Carnoy-, formol- og sublimatalkoholpræparaterne, hvor der til gengæld fandtes tegn på dårlig fixation (udflyden af cellegrænser, opflossen af cellerne og tab af børstesømmen, i forbindelse med skrumpning af kerner og væv).

Ved kontrolundersøgelse af nyrevæv fra 12 marsvin, gennemskyllet planmæssigt med 6 forskellige fixationsvædsker, er fixationen fundet væsentlig bedre i præparater fixerede i kaliumbikromatholdige vædsker og i Susa, medens der i præparater fixerede i formol, Carnoys vædske og sublimatalkohol findes udtalte forandringer af kerner og celler. I de sidstnævnte præparater er kernefarvningen fundet den mest intensive (bortset fra Carnoy-præparaterne efter gallocyaninfarvning). Imidlertid må en god fixation foretrækkes fremfor en dårlig fixation med en tilsyneladende god kernefarvning, fordi en dårlig fixation ikke kan ændres, hvorimod det i reglen er muligt af få en god kernefarvning frem ved overfarvning og differentiering.

Fixation med kaliumbikromatholdige vædsker (bedst Kaformacet) og Susa bliver således at foretrække ved den intravitale gennemskylningsfixation.

Hvorfor Carnoy, formol og sublimatalkohol giver en så slet fixation, er vanskeligt at sige, men måske skyldes det et for ringe eller manglende indhold af imprægnerende metalsalte?

2. De i denne sammenhæng undersøgte labyrinther er afkalkede med myresyre-formiatblanding nr. 10 og farvede med *Bøhmers* og *Weigerts* hæmatoxyliner.

Efter fixation med Kaformacet ses let skrumpning af den afkalkede labyrinthkapsel efter indlejringen i paraffin. Iøvrigt står det cortiske organ smukt og klart. Der er ret udtalt afsmalning og afløsning af de indre sulcusceller. Gangliecellerne tegner sig smukt og skarpt.

Efter fixation med Kaformisal ses det cortiske organ noget opløst, særligt gældende for indre og ydre sulcusceller. Gangliecellerne svarer ret nøje til forrige præparat.

Efter fixation med Susa ses det cortiske organ lige så pænt som efter fixation med Kaformacet, idet der dog er væsensforskelle i de to præparater. Cellerne i susa-præparatet er højere, særligt i ydre sulcusceller, og der er ikke afløsning af indre sulcusceller. Kernetegningen er ikke så intens.

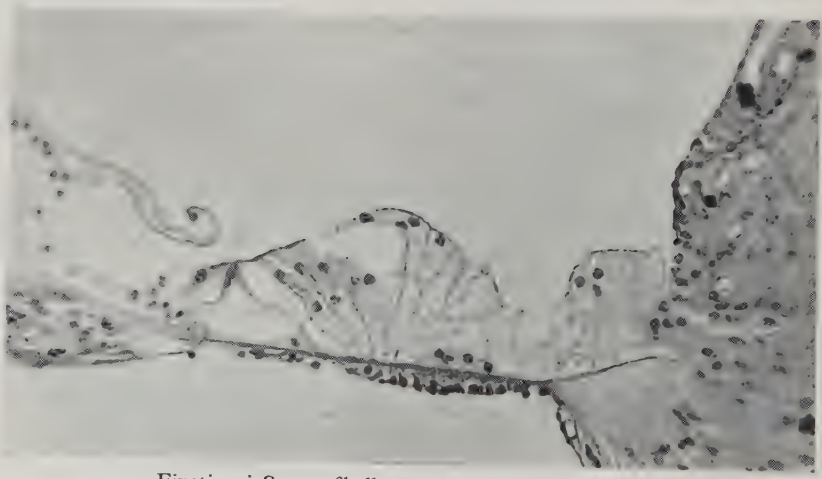
Det sublimatalkoholfixerede labyrinthpræparat viser en så godt som ophævet farvning af kernerne. Det cortiske organ er næsten opløst uden antydning af kernetegning nogetsteds. Der findes opblødning af ligamentum spirale og afløsning af stria vasculosa. Gangliecellerne ses som forholdsvis stærkt farvede klatter uden tydelig distinktion mellem kerner og cytoplasma.

Efter fixation med *Carnoys* vædske ses et præparat, der indtager en mellemstilling mellem det kaformisal-fixerede og det sublimatalkohol-fixerede, nærmest det sidste. Der er ret udtalt opblødning af det cortiske organ med delvis opløsning af dette, særligt udtalt for de indre sulcuscellers vedkommende. Gangliecellerne er stærkt skrumpede.

Efter fixation med 10% formalin ses det cortiske organ med tilhørende indre og ydre sulcusceller stærkt defigureret. Samme forandringer findes i mindre grad i stria vasculosa. Kernefarvningen er intens, men samtidigt ses en udtalt skrump-

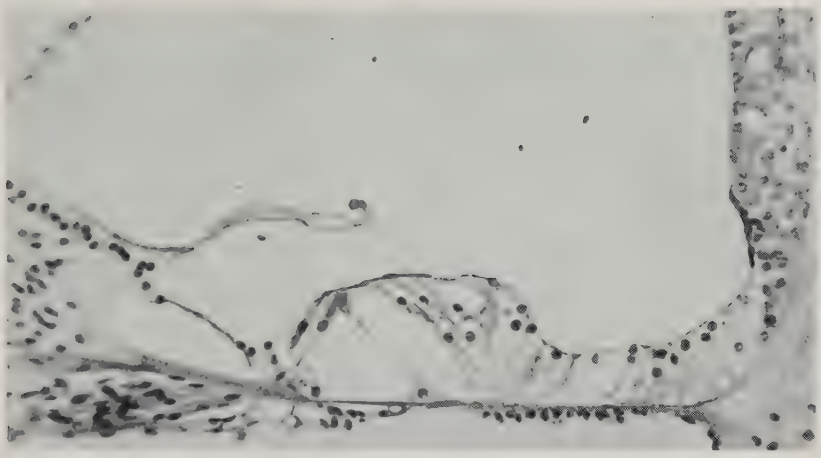
Figurtavle IX
Organon corti, weigertfarvning
(225 x)

Fixation i Kaformacet, afkalkning i salpetersyre

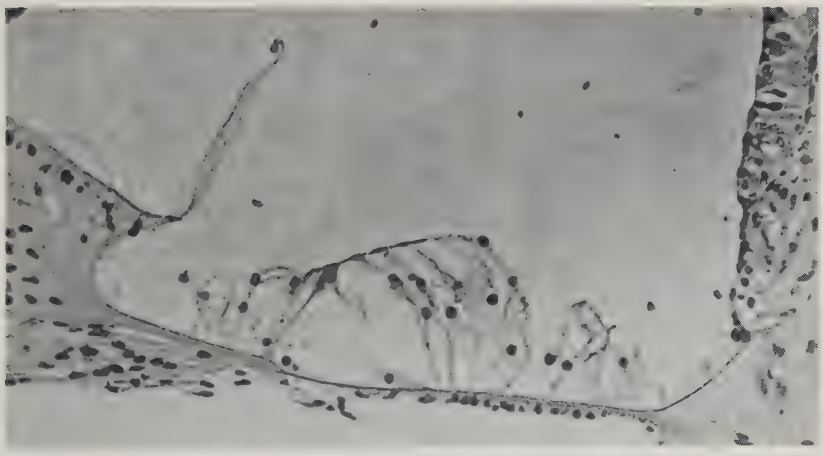


Fixation i Susa, afkalkning i myresyreblanding X.

Figurtavle IX
(fortsat)

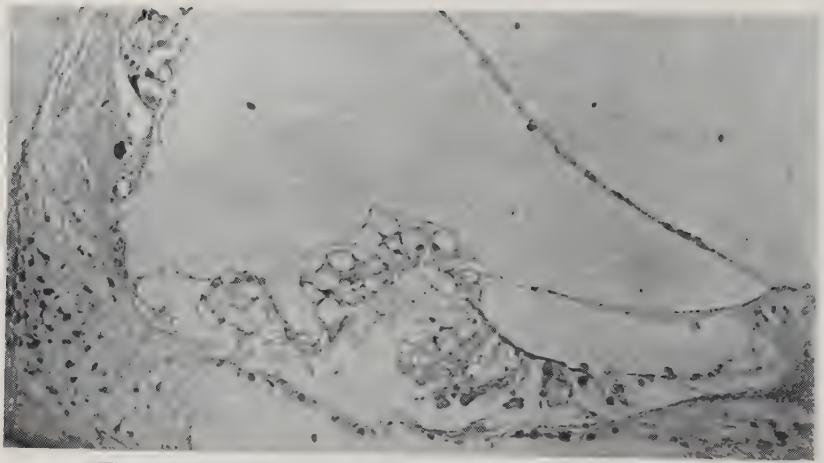


Fixation i Kaformacet, afkalkning i myresyreblanding X.

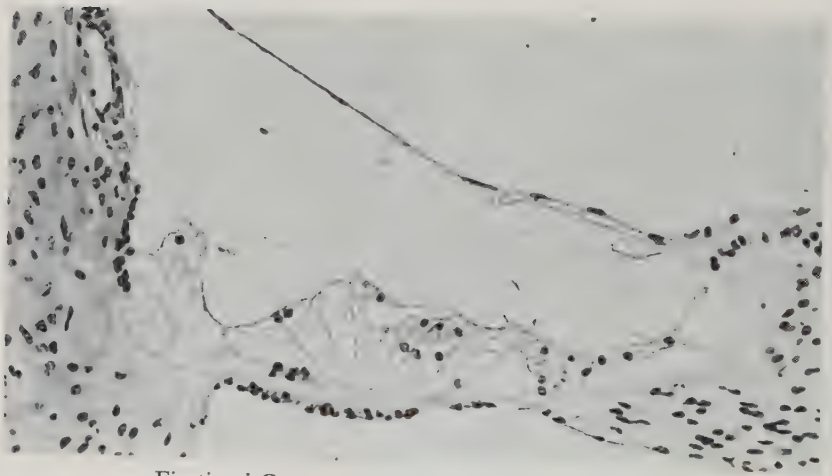


Fixation i Kaformisal, afkalkning i myresyreblanding X.

Figurtavle IX
(fortsat)

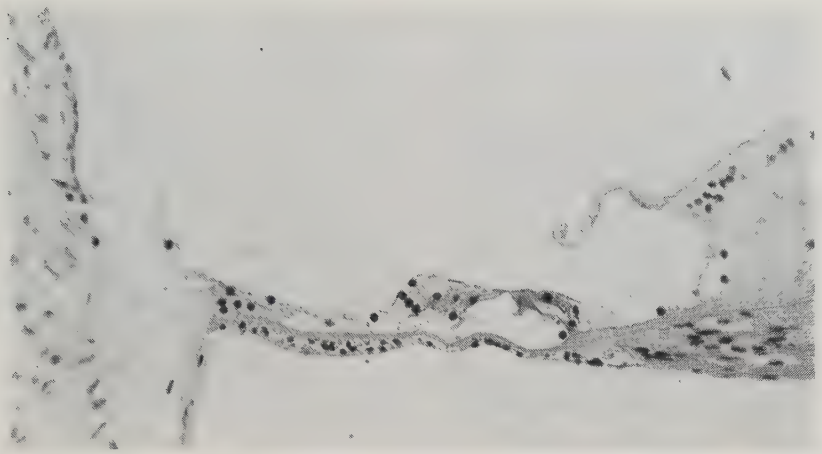


Fixation i sublimat-alkohol, afkalkning i myresyreblanding X.



Fixation i Carnoy, afkalkning i myresyreblanding X.

Figurtavle IX
(fortsat)



Fixation i formalin, afkalkning i myresyreblanding X.

ning af kernerne, som det også findes i det defigurerede cortiske organ. Ganglie-cellerne er små, ret stærkt farvede, uden tydelig overgang mellem kerne og cytoplasma og med ret stor, pericellulær, lys zone.

Det ses herefter, at der er fuld overensstemmelse mellem fundene ved nyrekontrolforsøgene og de egentlige labyrinthforsøg, idet begge forsøg gav til resultat, at de kaformacetfixerede og susafixerede præparater var bedst i henseende til fixation, medens de øvrige præparater måtte betegnes som slette.

Forsøget viser altså også, at man i sine gennemskylningsforsøg med stor sikkerhed kan skønne over fixationens bonitet ved en undersøgelse af de tilhørende nyrer.

3. Foruden disse undersøgelser i sædvanligt mikroskop (amplitudemikroskop) er der foretaget fotografering af ganglion spirale ved hjælp af fasekontrastmikroskop.

Da denne undersøgelsesmetode er ret ny, skal princippet for den lige omtales. Vi ved, at absorberende (farvede) elementer i et mikroskopisk præparat formindsker amplituden af det gennemfaldende lys og derved fremkalder intensitetssvækkelse, der i billedet ses som mørke i forhold til omgivelserne: Elementerne står altså i en vis kontrast til baggrunden (Amplitudepræparat). Når det drejer sig om ikke absorberende objekter, i hvilke een struktur kun afviger fra andre ved forskellig tykkelse eller forskellig optisk tæthed (forskelligt brydningstal), ændres amplituden af det gennemfaldende lys ikke. Imidlertid ændres det gennemfaldende lys' fase. Men dette kan ikke opfattes af det menneskelige øje eller den fotografiske plade, hvorfor strukturerne i et sådant præparat (fasepræparat) bliver mere eller mindre usynlige. Fremgangsmåden ved at fremkalde fasekontrast synlig for det menneskelige øje og den fotografiske plade beror på, at man ændrer svingningstilstanden i det af fasepræparatet frembragte bøjningsspektrum, så der kommer lighed med det bøjningsspektrum, som frembringes i amplitude-

præparatet. Fasepræparatet præsenterer sig herefter som et amplitudepræparat. Denne ændring i svingningstilstanden frembringes ved at influere på lysets fase i fasepræparatet ved hjælp af et indgreb i lysets bøjningsspektrum. I praksis former det sig på den måde, at man anbringer et faseændrende lag i objektivet. Det er et tyndt, gråligt lag, som medgiver det lys, der går igennem en faseændring på 90°, medens lyset, der passerer udenfor, ikke får en sådan ændring.

Disse undersøgelser fandt sted på Lunds Universitets histologiske Institution med hjælp af med. dr. *B. Gustavsson*, idet det viste sig at være vanskeligt at foretage indstilling på optimal fasekontrast.

Der fotograferedes med et mikrofotografiapparat af type »Ultraphot«. Som belysning anvendtes en vandkølet højtrykkviksølvlampe på 300.000 normallys. Den forsynedes med strøm på 600 volt fra en særlig transformator.

Resultatet fremgår bedst af fotografierne, hvoraf kun nogle er fremstillede her i arbejdet.

De fleste af fotografierne repræsenterer ganglieceller fra labyrinther, der er afkalkede i myresyre-formiatblanding nr. 10, kun et enkelt susa-præparat afkalket i 1 normal salpetersyre er afbildet til sammenligning.

Resultatet af denne undersøgelse stemmer i det store og hele med, hvad der er fundet ved de tidligere omtalte undersøgelser over fixationen, idet det susa- og kaformacetfixerede præparat er det bedste med mindst skrumpning og de klareste og skarpeste kerner og kernemembraner. Kaformisal og Carnoy giver praktisk talt lige dårlige ganglieceller, stærkt skrumpede, med store, omgivende cellehuller og med stærk udflyden mellem kerne og cytoplasma.

I forhold til de to sidstnævnte er fixationen i formol og sublimatalkohol lidt bedre, men dog med uregelmæssige konturer og ikke på nogen måde ideel.

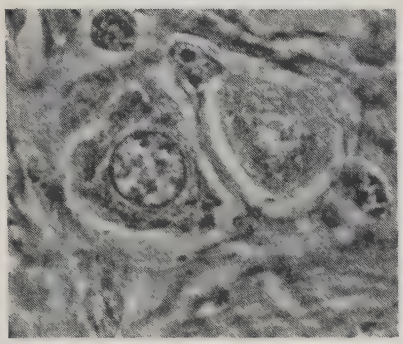
Ved sammenligning mellem de to susa-præparater ses præparatet, der er afkalket i myresyreformiatblandingen at være det bedste, idet det andet præparat viser meget uregelmæssige celle- og kernekonturer og specielt utydelig kernemembran. Det fremgår desværre ikke af nogen af de afbilledede forstørringer; men i et kaformacetfixeret præparat, som var afkalket i salpetersyre, sås der flere steder tydelige opblæringer i kernemembranen, hvad der ikke fandtes i det tilsvarende myresyreformiatafkalkede præparat. Sidstnævnte præparat er afbildet og viser et par ganglieceller ved 1500 gange forstørring, hvor især den ene udviser smuk kernemembran.

I cytoplasmaet findes uddifferentieret Nissl-granula, og iøvrigt er cellerne næsten uden skrumpning, idet de i denne henseende ligner gangliecellerne i susa-præparatet.

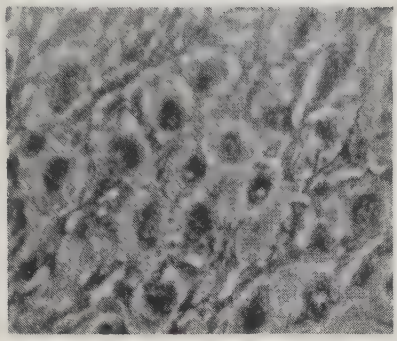
Altså fandtes det også ved denne undersøgelsesmetode, at fixationen med Kaformacet og Susa var bedst. Desuden konstateredes det, at afkalkning med myresyreformiatblanding nr. 10 i modsætning til afkalkning med salpetersyre ikke gav anledning til cytologiske forandringer.

I denne sammenhæng er det med henblik på fixationen af Nissl-substansen værd at lægge mærke til, at *Delaney* har fundet formol-zenker, og *Einarson* har fundet zenker-iseddike som et godt fixativ, og at *Delaney* udtaler, at *Carnoys* vædske ligesom de øvrige alkoholiske fixativer giver ret udtalte skrumpninger.

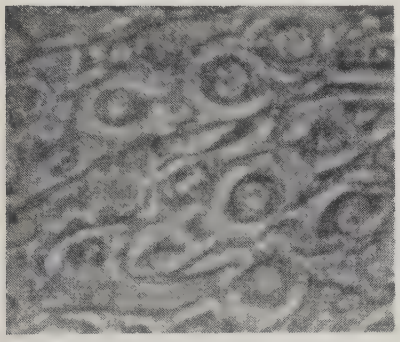
Figurtavle X
Fasekontrastbilleder af ganglion spirale



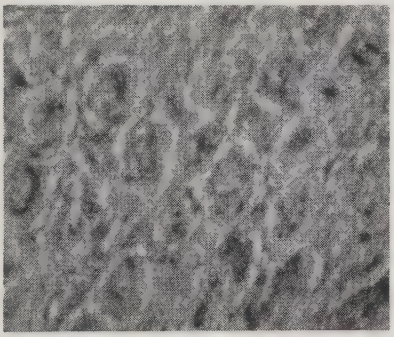
HCOOH-bl. — Kaformacet, 1500×



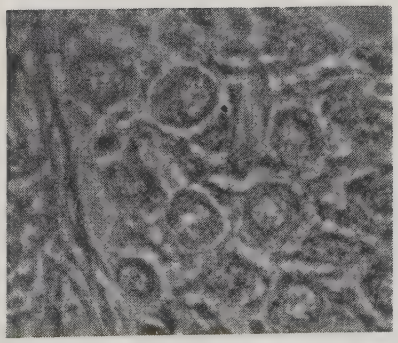
HCOOH-bl. — Kafisal, 760×



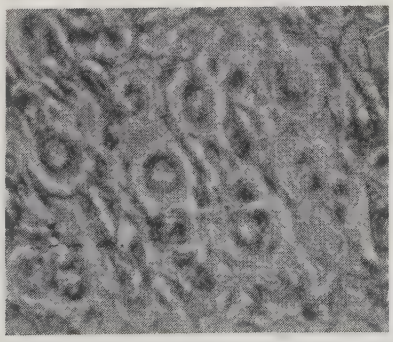
HCOOH-bl. — Kaformacet, 760×



HCOOH-bl. — formol, 760×

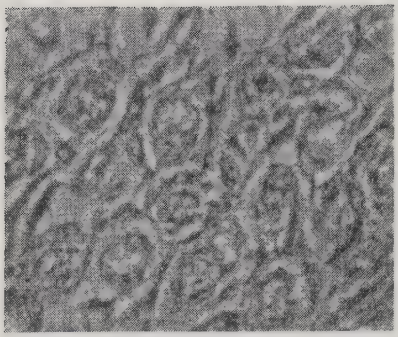


HCOOH-bl. — Susa, 760×

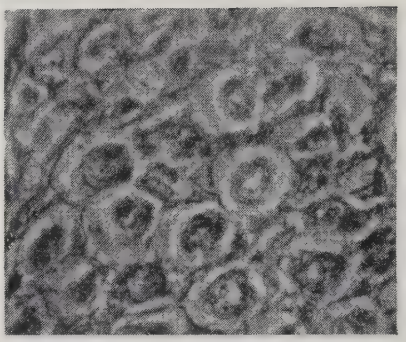


HCOOH-bl. — Carnoy, 760×

Figurtavle X
(fortsat)



HNO_3 Susa, 760×



HCOOH-bl. — subl.-alk., 760×

C. *Afkalkning*

Den benede labyrinthkapsel er meget hård, og da denne hårdhed kunne sættes i forbindelse med forekomst af specielle uorganiske salte eller en særlig lejring af krystallerne i disse salte, foretoges nogle røntgenspektrografiske undersøgelser på »Den kongelige Veterinær- og Landbohøjskoles« kemiske laboratorium ved dr. phil. *A. Tovborg-Jensen*. Det var oprindeligt hensigten med denne metode at søge afledt, hvordan man skulle bringe afkalkningen af dette hårde væv i stand.

Metoden anvendes ellers til identifikation af krystallinske stoffer, og princippet er følgende:

Hvis en fin, monokromatisk røntgenstråle falder på et fint krystalpulver, tilbagekastes lyset i visse retninger. Det tilbagekastede lys giver, når det rammer en omkring pulveret opspændt film, et såkaldt røntgenspektrogram, visende sig som liniespektre, hvert af karakteristisk udseende og konstant for de forskellige krystallinske stoffer. De herved fremkomne diagrammer kaldes *Debye*-diagrammer og kan sammenlignes med de krystallinske stoffers fingeraftryk, idet man ved hjælp af disse diagrammer altid er i stand til at identificere alle krystallinske stoffer i en hvilken som helst blanding *(A. Tovborg-Jensen & J. E. Thygesen, Brandenberger & Schinz)*.

Iøvrigt var der ved røntgenspektrografi påvist følgende kendsgerninger:

1) Benfosfat, tandemaille og dentin er sammensat af apatit, hvor fluorapatit med formlen $Ca_5(PO_4)_3F$ er den vigtigste.

2) Partikler af benapatit, dentinapatit og emailleapatit har kolloide dimensioner. Heraf er partiklerne i emailleapatiten langt de største. At partiklerne i de to andre former er små ses ved sammenligning med pulverdiagrammer af krystallinsk apatit, hvor linierne i sidstnævnte er smallere.

3) Endelig har det vist sig, at apatitpartiklerne ikke ligger tilfældigt i emaillen, men er orienteret på en bestemt måde (med de krystallografiske C-axer næsten parallelle), hvorimod der i ben- og dentinapatit ikke findes nogen speciel orientering *(A. Tovborg-Jensen & E. Møller)*. Herved får man en forklaring på den

overordentlige hårdhed af emaillen, og noget lignende håbede jeg at kunne konstatere for labyrinthkapslens vedkommende.

Til undersøgelsen blev der anvendt fint pulveriserede marsvinelabyrinther, dels friske, dels fixeret i Kaformacet og derpå skyllet i rindende vand.

Skylningen i rindende vand gav anledning til en mistydning af indholdet af krystallinske bestanddele i een af labyrintherne, sandsynligvis hidrørende fra tilblanding af calcit fra postevand.

Iøvrigt anvendtes der til undersøgelsen over krystallernes orientering ca. 3 mm lange og knapt 1mm tykke cylindriske stykker af hestelabyrinth, som var tildannet ved rulning mellem let fugtede carborundumstene.

Det viste sig, at labyrinthkapslen i det væsentlige var opbygget af hydroxylapatit, og ydermere viste det sig, at der ikke var nogen speciel orientering af de krystallografiske axer, så labyrinthknoglevævet altså ikke adskilte sig fra almindeligt benvæv.

Ved afkalkningen er anvendt intravitalt fixerede hoveder af marsvin. Hovederne er efter skylning i rindende vand i 24 timer savet igennem på tværs i vertikalplanet lige foran bullae tympanicae og derefter savet igennem på langs i sagittalplanet. Forinden er fjernet alle overflødige vævsdele. Herved fås stort set de to siders ossa temporalia med tilhørende labyrinther.

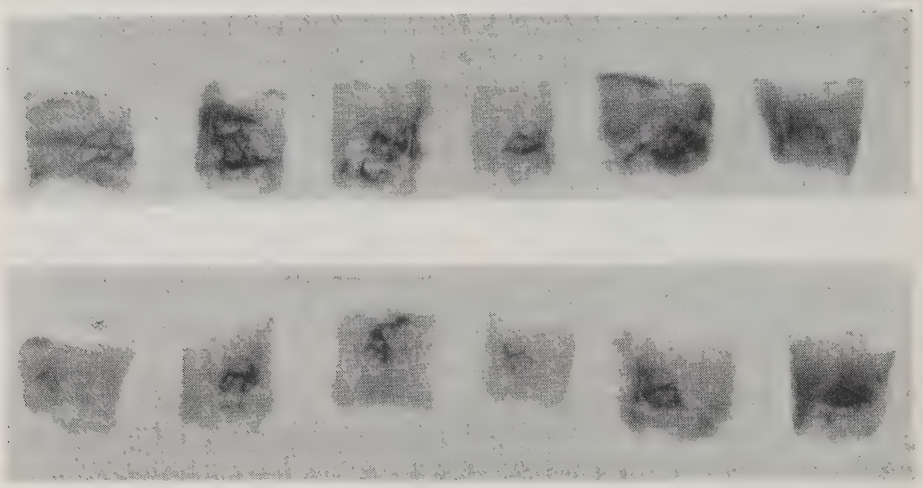
Afkalkningens forløb og slutpunkt konstateredes ved hjælp af røntgenfotografering i lighed med knoglepladernodelforsøgene, idet anvendelse af skæren eller stikken med nåle i disse præparater ville være uheldigt for de sarte endokapsulære væv. Som afkalkende medier anvendtes 1 normal salpetersyre med pH ca. 0 (den sædvanligt anvendte syre i den mest almindelige koncentration: Ca. svarende til 6%) og myresyreformiatblanding nr. 10 (med pH = 2.2).

Der anstilledes ialt tre forsøg, hvoraf det første på marsvinelabyrinther, der tidligere var intravitalt fixerede. Det viste sig, at afkalkningstiden var meget varierende indenfor hver enkelt af de to syregrupper. Dog viste de to hovedhalvdele i salpetersyre og myresyreformiatblanding ret konstante tidsrelationer. Således afkalkedes for exempel et os temporale i løbet af 16 timer i salpetersyre, medens det tilsvarende i myresyreformiatblandingen afkalkedes på 32 timer. Et andet os temporale afkalkedes i salpetersyre på 45 timer — det tilsvarende i myresyreformiatblandingen afkalkedes på 3½døgn. Uregelmæssighederne var altså ikke forårsagede af uregelmæssigheder i syrernes afkalkende evne, men skyldtes variation i dyrenes alder. Det skal tilføjes, at samtlige ossa temporalia under afkalkningen var ophængt i tråd og alle i lige stor afstand fra vædskeoverfladen, således at der ikke som følge af forskelle i diffusion skulle kunne opstå ovennævnte forskelle i afkalkningstider.

Ved det næste forsøg, som samtidigt skulle tjene til at illustrere anvendeligheden af forskellige fixativa til intravital fixation, blev der anskaffet 12 marsvin af samme alder (4–5 måneder) og af samme vægt (ca. 400 gram) fra Statens Seruminstitut.

Ved forsøget (Labyrinthafkalkning II) viste det sig, at afkalkningen var ensartet med følgende tider: I salpetersyre 1 døgn, og i myresyreformiatblanding 2 døgn.

Figur 11.
Fotokopi af røntgenbillede af marsvinelabyrinther afkalkede i 1) myresyreblanding, 2) salpetersyre. (Labyrinthafkalkning I).



Endelig blev der foretaget et forsøg (labyrinthafkalkning III), hvor der af hensyn til resultatet af røntgenforsøg XII (afkalkning ved 4° C. med fund af relativt godt bevaret Nissl-substans efter farvning med gallocyanin og trods påvirkning med 1 normal saltsyre og salpetersyre) foretoges afkalkningsforsøg på et par labyrinther med disse syrer og ved ovennævnte temperatur. Afkalkningen foregik i isskab med en temperatur af 4–5° C., og der foretoges daglig kontrolrøntgenfotografering.

Det viste sig, at afkalkningen på denne måde tog 3 døgn, og ydermere viste det sig, at Nissl-substansen efter farvning med gallocyanin ikke kunne fremstilles. Der blev derfor afstået fra yderligere forsøg i denne retning.

Disse forsøg viste, at afkalkningstiden varierede med alderen, fortrinsvis på den måde, at jo ældre dyrene var, des længere tid varede det, inden afkalkningen var slut (fig. 11).

Ydermere viste det sig, at anvendelse af lave temperaturer ikke frembød nogen fordel i tidsmæssig henseende. Desuden led farvbarheden meget under denne langvarige påvirkning med stærk syre.

Endelig viste det sig ved anvendelse af dyr af samme alder, at afkalkningstiden for marsvinelabyrinther ved hjælp af 1 normal salpetersyre er ca. 1 døgn og for myresyreformiatblandingen ca. det dobbelte (2 døgn). Hertil kommer, som det senere skal vises, at sidstnævnte metode i farvemæssig henseende frembød fortrin, der vejer den lidt længere afkalkningstid op.

D. *Indlejringen*

Før farveundersøgelserne foretoges skylning af ossa temporalia fra labyrinthafkalkningsforsøg II i rindende vand i 24 timer, dehydrering og indlejring i paraffin.

Forinden var der dog foretaget forsøg over indlejring i celloidin, samt over indlejring i paraffin, hvor sidstnævnte alene er anbefalet af *Joseph Fischer* til otohistologiske formål.

Til forsøget anvendtes 4 marsvinehoveder, der var intravitalt gennemskyllede og havde stået i 70% alkohol i nogen tid.

Hovederne savedes igennem i frontalplanet foran bullae tympanicae, og den bageste del savedes igennem i sagittalplanet i to halvdele, hver med sin labyrinth.

Der afkalkedes udelukkende i myresyreformiatblanding nr. 10, hvorefter der skylledes i rindende vand i 24 timer for at fjerne syrerne.

Den ene sides ossa temporalia indlejredes i celloidin, medens de tilsvarende ossa temporalia indlejredes i paraffin. Paraffinen var specielt fremstillet til lejligheden, idet der til paraffin med smeltepunkt på 54° C. var sat ca. 20% gul bivox for at bevare blandingen smidig under den for seriesnitskæring nødvendige nedkøling af blokkene.

Celloidinindlejringen vidstes fra mine tidligere undersøgelser over det indre øre på marsvin (1945 og 1947) at være meget tidrøvende. Det tog ca. 2 måneder, og metoden tillod ikke skæring af snit tyndere end 12–15 mikron, hvor det endda var vanskeligt at skære de tyndere snit i serie. Disse forhold er klart pointeret af *Fischer*, der udtaler, at paraffinmetoden har følgende fordele: Den er enormt tidsbesparende, den volder ingen større vanskeligheder og den giver betydeligt tyndere snit. Stoffet er ikke nær så kostbart og betydeligt nemmere at fremskaffe. Endelig er der ikke nogen vanskelighed ved seriesnitfremstilling. *David* har ligeledes ved almindelig knoglehistologi anbefalet paraffin fremfor celloidin, og desuden har *Westin* og *Plum & Pindborg* indenfor tandhistologien gjort sig til talsmænd for anvendelsen af paraffin af praktisk talt de samme grunde som anført af *Fischer*. *Westin* fremhæver, at man i almindelighed kun kan anvende celloidinsnit til oversigtsbilleder, idet man ikke kan skære snittene tyndere end ca. 10 mikron (almindeligst mellem 15–20 mikron). For mikroskopiske studier af finere cellestrukturer anføres dette som en ulempe, idet snittene ved denne art undersøgelser højst må være 10 mikron og snit på 4–5–7 mikron er at foretrække. Disse snittykkelser kan man kun få med paraffin.

Hertil kommer, at der i dette arbejde måtte fremstilles paraffinsnit af hensyn til Nissl-farvningen, idet denne som pointeret af *Hoessli* og *Einarson* (1933) ikke er mulig efter indlejring i celloidin. Sidstnævnte forhold er konstateret ved talrige forsøg, før nærværende arbejde påbegyndtes.

Når hertil kommer, at Nissl-substansen af *Cowdry*, *Einarson*, *Bielschowsky* og *Hydén* fremhæves som den vigtigste faktor ved bestemmelsen af nervecellernes funktionelle aktivitet, er der grund nok til at foretrække paraffinindlejringen fremfor celloidinindlejringen.

Der forsøgtes først med den gængse metode: Afvanding i stigende koncentrationer af alkohol til xylol og videre til paraffin, hvor der under indsmeltningen blev taget hensyn til, at temperaturen i termostaten ikke oversteg 56° C. Højere temperatur bevirkede, at de afkalkede væv blev hårde. Trods denne forholdsregel, og til trods for nedkøling af blokkene i rindende vand eller i isskab (5° C.), var disse præparater meget hårde og vanskelige at skære.

Xylol forsøgtes undgået på to måder:

1) Ved at gå fra vand over dioxan direkte til paraffin. Herved blev såvel xylol som den stigende alkoholrække, der også i nogen grad gør afkalket væv hårdt, undgået.

2) Ved at anvende stigende koncentrationer af alkohol til absolut alkohol, herfra til cedertræsolie i 1 døgn med afskylning af cedertræsolien i 1–2 timer i ligroin og påfølgende indsmeltning i paraffin som sædvanligt.

Blokkene blev nedkølet i isskab (5° C.). Ved den følgende mikrotomering viste det sig, at begge vævsblokke var lige lette at skære.

Imidlertid var der en betydelig, makroskopisk synlig skrumpning af hjernevævet i det præparat, der havde været i dioxan, hvorfor cedertræsolie-ligroin-metoden blev den foretrukne.

Ved hjælp af denne metode anvendt på de salpetersyre- og myresyreformiat-afkalkede labyrinther fra labyrinthafkalkningsforsøg II lykkedes det at fremstille 6–7 mikron tykke snit i serie.

Princippet i metoden er at indskyde et intermedium mellem afvandingen og indlejringen i paraffin, som er i stand til at blødgøre det afkalkede væv, der allerede under afvandingen i alkohol i stigende koncentrationer bliver noget hårdere. Hertil er cedertræsolie fundet velegnet, men det må atter fjernes på grund af en vis uforligelighed med paraffinen. Som intermedium kunne også have været anvendt svovlkulstof. Dette stof er dog ikke anvendt på grund af dets gennemtrængende lugt, i særdeleshed da det viste sig, at cedertræsolie-ligroin-metoden ydede det ønskede.

E. *Vurdering af afkalkningen*

1. *Afkalkningstiden* er allerede omtalt side 149, hvoraf det fremgik, at den sædvanligt anvendte salpetersyre i vandig opløsning afkalkede på ca. 1 døgn, medens myresyreformiatblandingen nr. 10 afkalkede på ca. 2 døgn. Tiden for den sidste form for afkalkning er ikke overvældende ved anvendelse på marsvinetindingeben, og slet ikke når man tager den ret høje pH (2.2) i betragtning.

2. *Farveresultater.* Af arbejder indeholdende oplysninger om *farveresultater ved labyrinthhistologi* foreligger der tilsyneladende kun to baseret på egne iagttagelser (*Juul & Vraa-Jensen* og *H. K. Kristensen*). *Juul & Vraa-Jensen* har af farvemetoder anvendt *Bøhmers* hæmatoxylin, *Carazzis* og *Delafields* hæmatoxyliner, *van Giesons* bindevævsfarvning, *Einarsons & Bentsens* antracenblåtfarvning af Nissl-legemer, *Weils* myelinskedemetode og *Saxéns* sølvfarvning til axecylindre.

Om de sidste metoder udtaler forfatterne, at antracenblåtmetoden ikke var anvendelig til Nissl-farvningerne på den afkalkede labyrinth, selv om metoden iøvrigt var udmærket anvendelig på ikke-afkalkede snit. Antracenblåt-farvningen gav en ret diffus blåfarvning af alle strukturer, således at Nissl-legemerne ikke var distinkte. *Nissl's* ældre metode med farvning ved hjælp af en 0.3% toluidinblåtopløsning blev fundet bedre. Differentiering fandt sted med 70% alkohol. Det tilføjes, at sidstnævnte metode ikke var anvendelig i lige høj grad på alle snit, men sædvanligvis fandtes der nogle steder i hvert snit, som egnede sig til denne form for Nissl-farvning.

Myelinskedefarvningen efter *Weil* gav udmærkede resultater.

På nogle af snittene forsøgtes også *Saxéns* metode til sværtning af axecylindre. Forfatterne fandt metoden ret kompliceret.

De anvendte afkalkning med 5% salpetersyre-formol.

Harald K. Kristensen (1945) anvendte den samme afkalkningsmetode og foretog på labyrinthsnit en systematisk gennemprøvning af en række farvemetoder for at finde de mest velegnede.

Af oversigtsfarvninger anbefaledes *Carazzis*, *Weigerts*, *Meyers*, *Delafields* og *Ehrlichs* hæmatoxyliner.

Ved farvning af Nissl-granula fandt forfatteren i modsætning til ovenstående forfattere *Einarsons & Bentsens* farvning med antracenblåt ganske udmærket, idet Nissl-granula fremtrådte sorteblå på en lys blå baggrund (ringe medfarvning af celloidinen). Det konstateredes samtidigt, at stærkt kromerede snit (meget gule snit) gav slette resultater.

Der var til dette formål forsøgt anvendelse af *Nissl's* toluidinblåtmetode (*Romeis* § 1422) med differentiering med forskellige midler, men med dårligt resultat, idet Nissl-granula præsenterede sig meget vagt og udflydende på stærkt medfarvet baggrund. Endvidere var forsøgt *Wittmaacks* thioninmetode samt *Schmorls* metode med lige så dårlige resultater.

Desuden forsøgtes med gallocyaninkromalunlak efter *Einarsons* angivelse (1932), men med dårligt resultat. Det blev ikke bedre ved forsøg på at fjerne celloidinen, som medfarvedes stærkt. Årsagen hertil var først og fremmest, som påpeget af *Einarson* (1935), den forudgående behandling af vævet med stærk syre. Det var hensigten at foretage forsøg med gallaminblåt, som ifølge *Einarsons* undersøgelser (1935) skulle kunne tåle behandlingen med stærke syrer, men det er ikke på noget tidspunkt lykkedes at skaffe dette farvestof.

Til fremstilling af myelinskeder anbefaledes *Benda-Spielmeyers* metode (*Romeis* § 1495), idet der desuden var foretaget experimenter med *Weils*, *Stoeltzners*, *Kultschitzkys* (*Romeis* § 1486) metoder og med *Wittmaacks* sekundære osmiering, alle med godt resultat.

Til fremstilling af axecylindrene var forsøgt *Davenports* metode og den samme metode i *Vraa-Jensens* modifikation, med eller uden guldbad a. m. *Podhradszky*. Forfatteren anbefalede *Saxéns* modifikation af *Bielschowsky-Maresch'* sølvmetode.

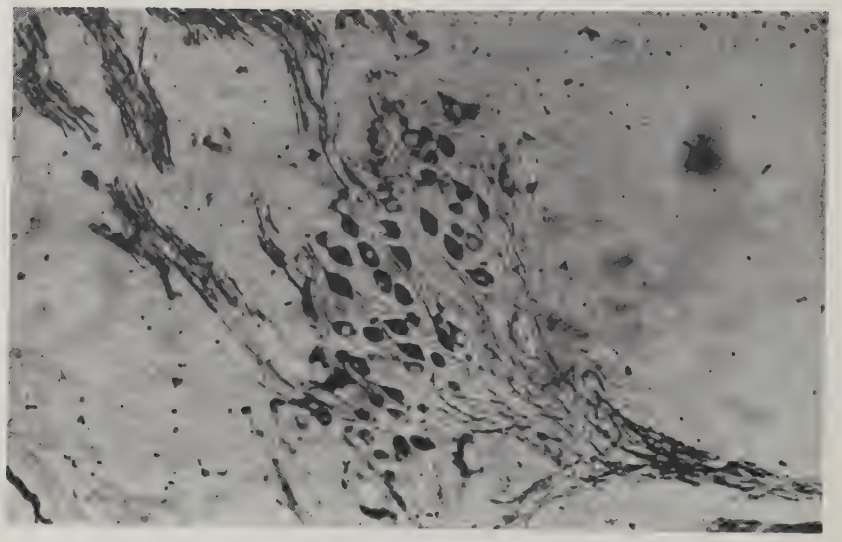
I nærværende arbejde foretoges undersøgelse af farvningen af labyrinthen med følgende farvemetoder:

Gallocyaninkromalunlak
Bøhmers og *Weigerts* hæmatoxyliner
Weils marvskedefarvning
Altmann-Kulls mitochondriefarvning
Saxéns sølvmetode

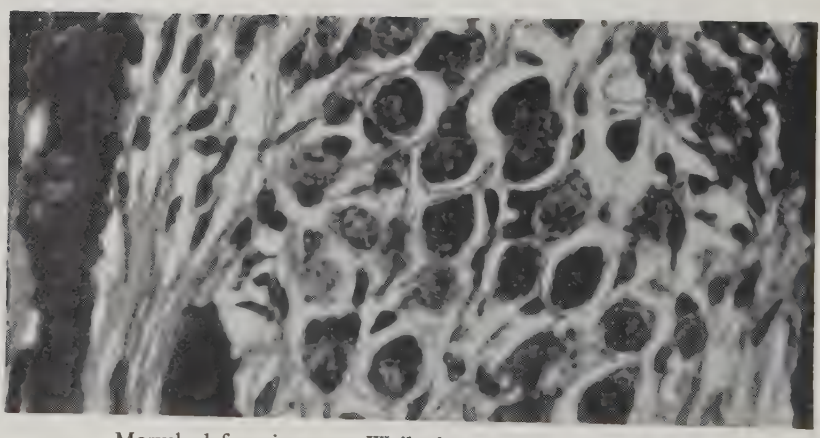
samt enkelte farvninger med *Romanowsky-Giemsa* på småfelter af knoglemarv, som fandtes i præparaterne.

Gallocyaninfarvningen viste Nissl-substansen ufarvet i de salpetersyreafkalkede præparater, højst med svage tilløb til farvning i de store multipolare ganglieceller i cerebrum. Kernefarvningerne var ret svage i alle præparater, stærkest i de sublimatalkoholfixerede præparater. De myresyreformiatafkalkede præparater

Figurtavle XII
Labyrinthspecialfarvninger

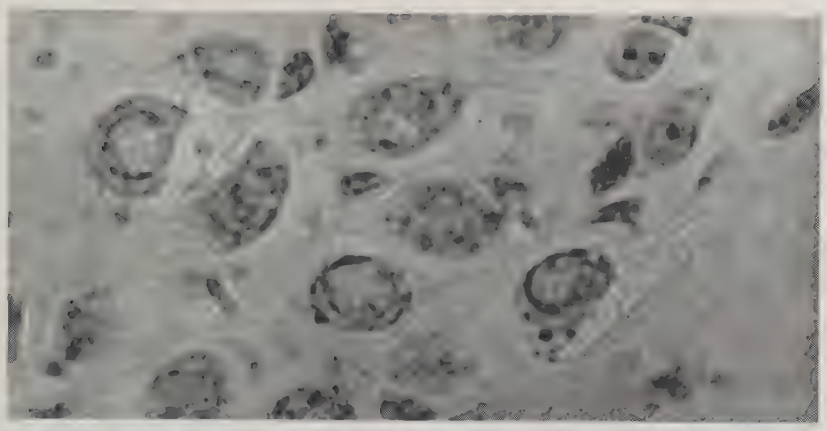


Sølvimpregnation a. m. Saxén af n. cochlearis (180×).

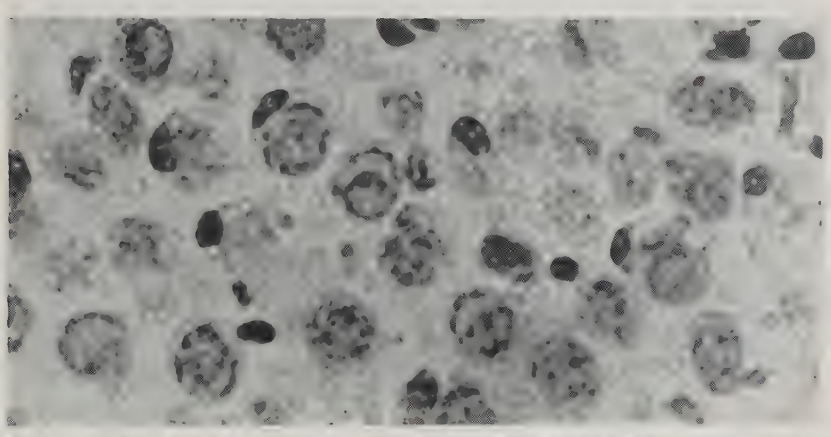


Marvskedefarvning a. m. Weil på ganglion spirale (225×).

Figurtavle XII
(fortsat)



Gallocyaninfarvning a. m. Einarson på Nisslsubstans (950). (Fix. i Kaformacet).



Gallocyaninfarvning a. m. Einarson på spiralgangliecellernes Nisslsubstans (950 ·).

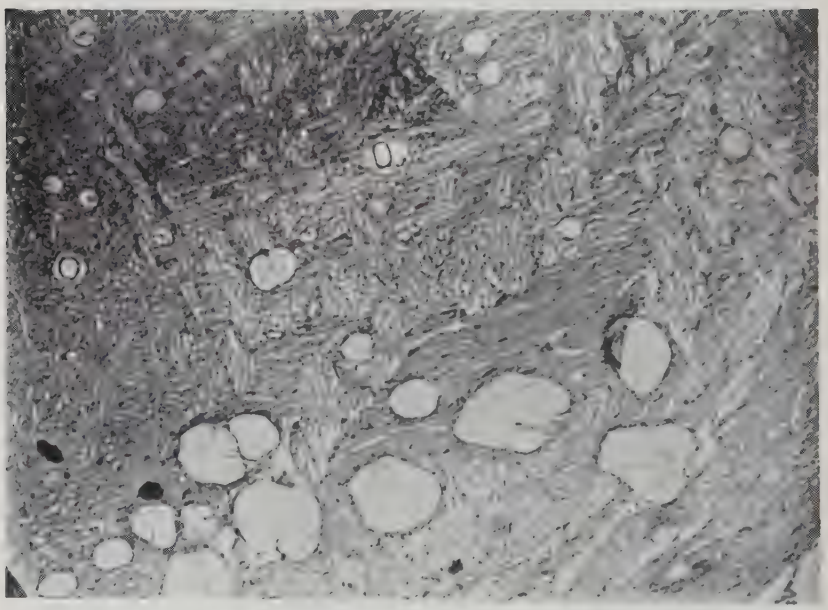
viste alle uden undtagelse Nissl-farvning, hvis kvalitet i anden række afhang af fixationen.

Konklusionen blev, at præparater, der var afkalkede i myresyreformiatblanding nr. 10, med denne farvning viste udtalt overlegenhed i forhold til præparater, der var afkalkede i 1 normal salpetersyre. Det gjaldt både kernefarvningen og Nissl-farvningen af de i cerebrum forekommende store, multipolare ganglieceller og af de til *cortiske* organ knyttede ganglieceller.

Indenfor de i myresyreformiatblanding nr. 10 afkalkede præparater viste følgende fixationsvædsker farvning af Nissl-substansen: Kaformacet, Kaformisal og *Carnoys* vædske. Af disse var Kaformacet de andre langt overlegen, væsentligst fordi der efter denne fixationsmetode kom mindre medfarvning af cytoplasmaet.

De carnoy-fixerede væv er alle skæmmede af en udtalt tendens til udtræden af vædske i de nervøse væv, særligt udtalt i cerebrum og i stammen af n. cochlearis, hvor der ses store caviteter indeholdende albuminrig vædske.

Figur 13.
Hjernevæv fra carnoy-fixeret marsvin.



De salpetersyreafkalkede præparater viste en slet kernefarvning ved samtlige fixationsmetoder. Gangliecellerne i hjernen og i cochlea var meget svagt farvede uden antydning af Nissl-substans.

Gallocyaninfarvning på præparater afkalkede med saltsyre og salpetersyre ved lav temperatur gav også negativt resultat, idet det heller ikke ad denne vej lykkedes at fremstille Nissl-substans.

Bøhmer- og Weigert hæmatoxylin-farvninger (se figurtavle 9, side 142): Der undersøgtes for fixationens kvalitet og for farveresultaterne efter de anvendte afkalkningsmetoder. Fixationen var bedst i de med Susa og Kaformacet fixerede

præparater. Ved sammenligning mellem farvningerne i de salpetersyreafkalkede og de myresyreformiatafkalkede præparater fandtes udtalt svækkelse af farvningen i de førstnævnte præparater, selv om der nok kunne fremstilles anvendelige præparater. I de salpetersyrebehandlede præparater fandtes tendens til udflyden af overgangen mellem kerne og cytoplasma (sammenlign forholdet ved de fasekontrastmikroskopiske undersøgelser), og endelig fandtes i disse præparater en utvivlsom skrumpning, mest udtalt for de kaformisalfixerede præparaters vedkommende. Også dette stemmer nøje med fundene ved fasekontrastmikrofotograferingen.

Ved sammenligning af farvningen i de forskelligt fixerede, myresyreformiatafkalkede præparater fandtes denne bedst i præparaterne fixerede i Kaformacet, Susa og formalin, 10%, men det sidste præparat var som tidligere omtalt skæmmet af skrumpninger og delvis opløsning af det *cortiske* organ.

Marvskedefarvning a. m. Weil: Det fandtes, at de endelige resultater nok til en vis grad var afhængige af fixationens kvalitet. Iøvrigt spillede det ingen rolle, om der var afkalket i den stærkt sure salpetersyre eller i den svagt sure myresyreformiatblanding.

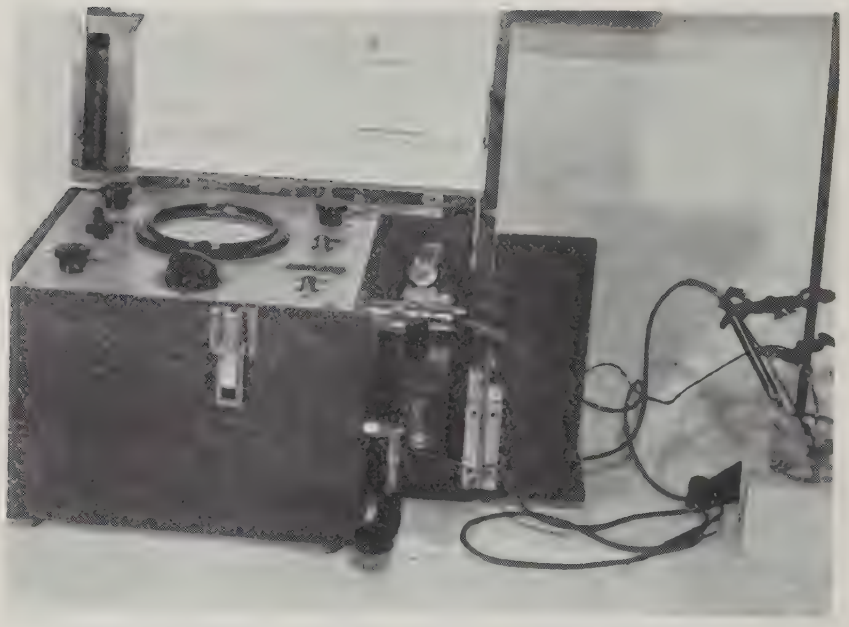
Mitochondriefarvning a. m. Altmann-Kull: Denne gav kun nogenlunde brugbare resultater ved anvendelse af kaformacetfixerede præparater i form af ret grove klumper af stærkt rødt farvede legemer liggende basalt og langs randene af hårcellerne. Om der var afkalket i salpetersyre eller myresyreformiatblanding var uvæsentligt. Undersøgelsesmetoden var ikke tilfredsstillende, idet især differentieringen af disse stærkt farvende vædsker voldte store vanskeligheder.

Sølvimprægnation a. m. Saxén: Det sås, at der ikke var større forskel på præparater afkalkede med salpetersyre og myresyreformiatblandingen, omend den sidste gav noget bedre resultater. Herudover fremgik det, at de kaliumbikromatholdige fixationsvædsker gav de bedste resultater. Af de anvendte vædsker var Kaformacet den mest overlegne i henseende til sværtning af axecylindre og af de i gangliecellernes protoplasma forekommende argyrofile strukturer. I kaformacetpræparaterne er der desuden fundet en ophobning af argyrofile elementer i de *Boettcherske* celler (i basalvindingen), idet såvel kerner som cytoplasma er fuldstændigt ufarvet. Sidstnævnte forhold er ikke omtalt i litteraturen. Betydningen af disse argyrofile elementer er usikker, selv om den påfaldende lighed af *Boettcher*-cellerne (udseende af protoplasma og kernernes kromatinrigdom) med hårcellerne antyder, at disse celler kan have betydning for høreopfattelsen.

Farvninger af knoglemarvspartier i labyrinthen med azur-eosin

Knoglemarvsfarvningen fremtrådte kun pænt i de kaformacet- og susa-fixerede præparater. Der var en meget tydelig forskel på marvcellefarvningen i de salpetersyre- og de myresyreformiatafkalkede præparater. De salpetersyreafkalkede præparater var blegt røde med svagt grønne farvetoner uden overgange, medens der i de myresyreformiatafkalkede præparater sås stærkt røde og blå farvetoner med overgangsfarvetoner. Farvningen var ikke helt tilfredsstillende og bør undersøges med svagere myresyreformiatblandinger og ved hjælp af *Maximows* puffede azur-eosin, en undersøgelse som dog falder udenfor rammerne af nærværende arbejde.

Figur 14.
Apparatopstilling ved labyrinth-pH-måling.



Figur 15.
Detailbillede af elektrodeanbringelsen.

Der er herefter næppe tvivl om, at man står sig ved at anvende myresyreformiatafkalkningen til histologisk undersøgelse af labyrinther til trods for lidt længere tid i anvendelse end 1 normal salpetersyre. Fixation med Kaformacet giver de bedste resultater. Efter denne kommer susa-fixationen med næsten lige så gode resultater, således at disse fixationsmetoder kan supplere hinanden udmærket.

3) *Labyrinth-pH-målinger.* Ved disse undersøgelser er der foretaget elektrometrisk måling af brintionkoncentrationen indenfor det indre øres benede kapsel under afkalkningen. Dette er foretaget for om muligt at klargøre, hvorledes man kan få nydelige præparater af det cortiske organ tiltrods for en ofte ret kraftig syrepåvirkning (sammenlign *Mygind & al.* (1945)).

Undersøgelsen foretoges med 1 normal salpetersyre og myresyreformiatblanding nr. 10. Der anvendtes gennemskylningsfixerede labyrinther, hvor hjernen var fjernet efter forsigtig overklipning af 7. og 8. hjernenerve.

Efter at præparaterne var ført igennem fra vand til absolut alkohol og videre til xylol (forinden var der med et tandlægebor fræset en åbning på nederste vinding ind til de endo- og perilymfatiske rum) monteredes ved hjælp af en særlig teknik (se forsøgsprotokollen side 222) en paraffinskorsten over hullet. Gennem dette førtes en fint udtrukket glaselektrode (se foto fig. 14–15). På fotografierne af opstillingen ses endvidere, hvorledes kalomelelektroden ved hjælp af et filiformt gummidræn førtes hen til præparatet. Ingen af elektroderne kom i kontakt med selve syrebadet.

Den nærmere teknik ved aflæsningerne er beskrevet i forsøgsprotokollen (side 222).

Der foretoges 7 forsøg af denne art, hvoraf de to (IV og VI) foretoges, efter at der var lavet direkte adgang til labyrinthens rum ved henholdsvis afklipning af labyrinthspidsen og fjernelse af stapes. Disse to forsøg viste med al tydelighed, hvorledes pH i syrebadet og pH i labyrinthen udnivelleres, når der skabes adgang på denne måde. Dog holder pH sig en del højere end det omkringliggende syrebads pH, antagelig som følge af, at der finder en afkalkningsproces sted. Først når afkalkningen er helt afsluttet, bliver pH udenfor og indenfor labyrinthkapslen den samme.

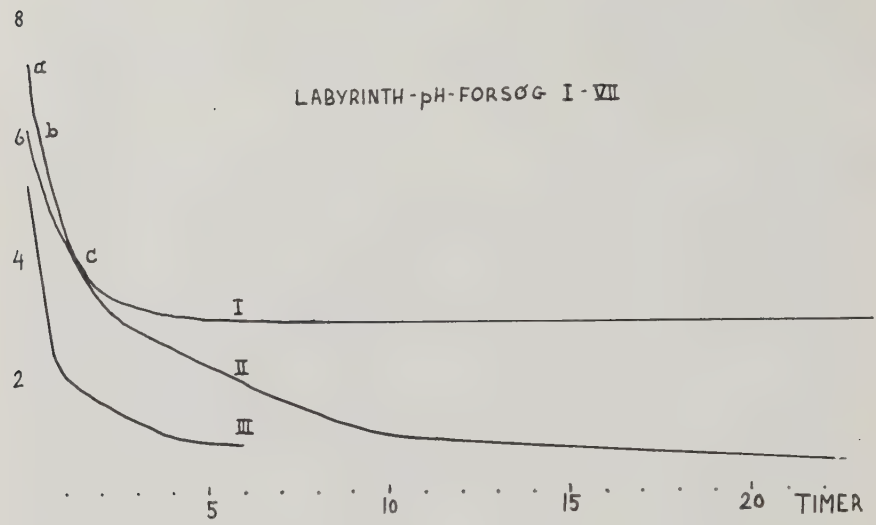
De øvrige forsøg illustreres bedst af omstående diagram.

Labyrinth-pH-forsøg I, II og III er foretaget med 1 n salpetersyre, forsøgene V og VII med myresyreformiatblanding nr. X.

I labyrinth-pH-forsøg II ligger kurven en del lavere end i forsøgene I og III (røret var i slutningen af forsøg II ikke helt tæt!). I de to andre forsøg ses kurven at forløbe noget længere ned i pH-værdi, men det varer dog 10 timer, inden pH indenfor labyrinthkapslen er nået ned på værdier, som med sikkerhed virker uheldigt på farvningen. I modsætning hertil ses, at kurverne for myresyreformiatblandingerne (som følge af disses højere pH) på intet tidspunkt når længere ned i pH-værdi end lidt under pH 3. På intet tidspunkt er der derfor større chance for beskadigelse af vævsfarvningerne. Iøvrigt forløber den første udligning i pH (indtil pH 3.5) nogenlunde ens for de to syrer.

Det forhold, at pH-kurven for den stærke syre, salpetersyren, først efter 10 timers forløb (ca. ½ af den samlede afkalkningstid) når ned på et for farvningen

Figur 16.
Diagram over labyrinthforsøg I—VII (—IV og VI).



Labyrinth-pH-forsøg I begynder ved b og fortsætter sig i kurve II
— – — II er repræsenteret af kurve III
— – — III begynder ved b og fortsætter i kurve II
— – — V begynder ved b og fortsætter i kurve I ved c
— – — VII begynder ved a og fortsætter i kurve I

skadeligt niveau, er måske en medvirkende forklaring på de ret gode vævsfarvninger, der kan opnås trods denne form for afkalkning. Den dybere forklaring må være labyrinthkapslens hæmmende indflydelse på syrevirkningen, idet syrerne først skal diffundere gennem denne, før en eventuel skadelig indflydelse kan nå at gøre sig gældende.

F. *Anvendte farvemetoder*

I arbejdet er anvendt følgende farvemetoder:

Farvning med *Bøhmers*, *Carazzis*, *Haidenhain-Regauds* og *Weigerts* hæmatoxyliner, foruden *Einarsons* gallocyaninfarvning, *Altmann-Kulls* mitochondriefarvning, *Weils* og *Benda-Spielmeyers* marvskedefarvninger samt *Saxéens* metode til imprægnation af nervetråde med sølv. Jeg har forsøgt at anvende *Bodians* sølvmetode (Anat. Rec. 65 : 91), men uden udbytte.

Carazzis, *Weigerts*, *Benda-Spielmeyers* og *Saxéns* metoder er samlet i et mindre arbejde om forskellige farvemetoders anvendelse på det indre øre hos marsvin: »Sur les méthodes de coloration pour l'examen histologique de labyrinthes de cobayes« (Acta Otolaryngologica, vol. XXXIII, fasc. 4–5, pag. 315–323, 1945).

Altmann-Kulls mitochondriefarvning er tillige med *Haidenhain-Regauds* hæmatoxylinfarvning anvendt og beskrevet i detailler i *Harald Okkels'* disputats: »Histofysiologiske undersøgelser over nyrefunktionen«, pag. 72, Levin & Munksgård, København, 1930.

Desuden er som hovedfarvemetode anvendt *Einarsons* gallocyaninkromalunlak, der allerede tidligere er beskrevet i teknisk henseende (side 00).

Endelig er der til de første oversigtsfarvninger anvendt *Bøhmers* hæmatoxylin. Den tilberedes i to opløsninger: Opløsning I består af 1 g. kryst. hæmatoxylin + 12 cc. abs. alkohol. Opløsning II består af 20 g kalialun + 200 cc. varmt destilleret vand (denne opløsning filtreres efter afkøling). Efter 24 timer blandes I og II, står i 8 døgn i en beholder med bred hals, for at der kan finde en passende modning sted. Den filtreres før brugen.

Farvetid: 15–20 minutter.

Resultat: mørkeblå kerner.

FORSØGSPROTOKOL

MODELFORSØG NO. I

(Rene syrer)

(Påbegyndt 2.4.46 kl. 1630).
(Undersøgelser over afkalkningstider og farvbarhed af kontrolvæv efter syrepåvirkning).

Knoglemodel: 1 cm lange stykker, frisk postmortelt fixerede ribben. Materialet stammer fra lungekirurgisk afdeling på Rigshospitalet. Efter fixationen hærdning i 70% alkohol 1 døgn og skylning i rindende vand 1 døgn.

Kontrolvæv: Nyre, hjerne og lever fra 2 marsvin, dræbt 30. 3. 46 ved nakkegennemklipning i æternarkose. Frisk, postmortel fixation i Kaformacet i 1 døgn, derpå hærdning i 70% alkohol, 1 døgn, og skylning i rindende vand i 1 døgn.

Stykker af disse væv tillige med knoglevævet, ophængt i en tråd, anbragtes i 100cc. af syreopløsningerne. Disse skiftedes dagligt. Afkalkningen kontrolleredes ved hjælp af stikke- og skæreprøven. Ved endt afkalkning af knoglevævet førtes nyre- lever- og hjernestykkerne gennem natriumsulfat (5%), skylledes og afvandedes, indlejredes i paraffin. Derefter skæring og montering på dækglas. Farvning af snittene med Bøhmers og Weigerts hæmatoxylin.

Syreart og styrke	Afkalkningens slutpunkt	Afkalkningstid
HNO_3, 5 %	Afsluttet 3.4. kl. 1430	ca. 22 timer
HCl, 5 %	— 3.4. kl. 1430	ca. 22 timer
H_2SO_4, 5 %	Endnu ikke afkalket eft. 14 døgn	>14 døgn
H_2SO_3, 5 %	Afsluttet 4.4. kl. 0930	ca. 41 timer
H_3PO_4, conc.	Endnu ikke afkalket eft. 14 døgn	>14 døgn
H_2CrO_4, 2 %	Afsluttet 11.4. kl. 1400	ca. 9 døgn
HCOOH, conc.	Endnu ikke afkalket eft. 14 døgn	>14 døgn
CCl_3COOH, 5 %	Afsluttet 5.4. kl. 0730	ca. 63 timer
$C_2H_4OHCOOH$, 10 %	— 8.4. kl. 0730	ca. 5½ døgn
$C_6H_8O_7H_2O$, 10 %	— 9. 4. kl. 0800	ca. 6½ døgn

Efter 14 dages forgæves afkalkningsforsøg med concentreret myresyre og fosforsyre findes de heri værende kontrolvæv for fosforsyrens vedkommende så godt som opløste og stærkt svulne. For myresyrens vedkommende er der udtalt svulst af vævene, særligt hjernevævet, men disse forandringer svinder makroskopisk fuldstændigt ved den påfølgende skylning i vand (rindende vand i 24 timer).

MODELFORSØG NO. II

(Rene syrer)

(Undersøgelse af afkalkningstid og farvbarhed af kontrolvæv efter syrepåvirkning)

Knoglemodel: 1 cm lange, kaformacetfixerede ribbensstykker.

Kontrolvæv: Lever-, hjerne- og nyrevæv fra 3 marsvin, intravitalt fixationsgennemskyllede med Kaformacet i æternarkose 18. 5. 46. Efterfixation 1 døgn i Kaformacet. Hærdning i alkohol og skylning i rindende vand 1 døgn inden forsøget sattes i gang (22. 5. 46 kl. 1500).

Stykker af disse kontrolvæv tillige med de 1 cm lange ribbensstykker ophængt i en tråd anbragtes som i modelforsøg I i 100 cc. af de forskellige syrer. Syrerne skiftedes dagligt. Afkalkningen prøvedes ved stikke- og skæremetoden. Efter endt afkalkning skylledes præparaterne i rindende vand 24 timer, afvandedes, indlejredes og blev skåret i 6-7 my tykke snit. Efter montering på objektglas farvedes snittene med *Bøhmers* og *Regaud-Haidenhains* hæmatoxylin og *Einarsons* gallocyaninkromalunlak.

Syreart og styrke	Afkalkningens slutpunkt	Afkalkningstid
HNO_3, 5 %	Afsluttet 23.5. kl. 1300	ca. 22 timer
HCl, 5 %	— 23.5. kl. 1300	ca. 22 timer
HNO_3, 10 % + Na-citrat (10 %)	— 24.5. kl. 0800	ca. 41 timer
H_2SO_3, 6 %	— 24.5. kl. 1300	ca. 46 timer
H_2SO_4, 5 %	Ikke afkalket efter >1 uge	>7 døgn
H_2CrO_4, 5 %	Afsluttet 25.5. kl. 1300	ca. 3 døgn
HCOOH, 10 %	— 24.5. kl. 1300	ca. 46 timer
CCl_3COOH, 5 %	— 25.5. kl. 1300	ca. 3 døgn
$C_2H_4OHCOOH$, 10 %	— 29.5. kl. 0800	ca. 7 døgn
$C_6H_8O_7,H_2O$, 10 %	— 27.5. kl. 0800	ca. 5 døgn

I dette forsøg er der ingen sikker makroskopisk skrumpning eller svulst af vævene, specielt ikke af væv, der har været i de 4 organiske syrer.

MODELFORSØG NO. III

(Syreblandinger)

(Påbegyndt 31.5.46 kl. 1830)

(Undersøgelse af afkalkningstid og farvbarhed af kontrolvæv efter syrepåvirkning)

Knoglemodel: 1 cm lange, frisk postmortelt fixerede ribbensstykker.

Kontrol af syreindvirkning på farvbarhed: Lever-, hjerne- og nyrevæv fra 3 marsvin, intravitalt fixationsgennemskyllede med Kaformacet i æternarkose 18. 5. 46. Hærdning i alkohol og skylning i rindende vand 1 døgn inden forsøget påbegyndtes.

Stykker af disse væv tillige med de i tråd ophængte stykker ribben anbragtes i glas med 100 cc. af syrerne. Syrerne skiftes dagligt. Afkalkningen prøvedes ved stikke- og skæremetoden. Ved endt afkalkning skylning af vævene i rindende vand i 24 timer, afvanding, indlejring og skæring. Farvning med *Bøhmers* og *Regaud-Haidenhain* hæmatoxylin og *Einarsons* gallocyaninkromalunlak.

En undtagelse ved efterbehandlingen dannede triklorformol-præp., som dels førtes til 96% alkohol, dels over Na_2SO_4 og vand til 96% alkohol — endvidere HCl—NaCl præp., som førtes over NaCl til vand.

Syreart (sammensætning) og styrke	Afkalkningsslutpunkt	Afkalkningstid
Kromsalpetersyre efter *Katz* (H_2CrO_4,0.5 g + HNO_3,5 cc. + aq. dest 100)	Afsl. 1.6. kl. 1830	ca. 24 timer
Salpetersyreformol efter *Werner* (HNO_3 + formol (10 %), lige dele	Afsl. 1.6. kl. 1830	ca. 24 timer
Salpetersyrefloroglucin efter *Haug* (10 cc HNO_3 + 1 g florogl. + 50 cc aq. dest.)	Afsl. 2.6. kl. 1330	ca. 2 døgn
Salpetersyrealkohol efter *Thoma* (HNO_3, conc., 70 cc. + 500 cc. 96 % alk.)	Afsl. ikke	over 1 uge
Saltsyre-natriumklorid *(v. Ebner)* (1—3 cc. conc. HCl + 100 cc. 10 % NaCl)	Afsl. 2.6. kl. 1030	ca. 40 timer
Trikloreddikesyre-formol (5 % CCl_3COOH + 10 cc. 40 % formol)	Afsl. 3.6. kl. 1330	ca. 3 døgn
Myresyre-citrat efter *Wagoner* (HCOOH, conc. + 20 % Na-citrat, lige dele)	Afsl. 4.6. kl. 1330	ca. 4 døgn
Myresyre-alkohol (HCOOH, conc. + lige dele 70 % alk.)	Afsl. ikke	over 1 uge

MODELFORSØG NO. IV

(Rene syrer + enkelte blandede)

(Påbegyndt 31.8.46 kl. 1630)

(Undersøgelse af afkalkningstid og vævsfarvbarhed efter påvirkning med syrer)

Knoglemodel: De sædvanlige ribbensstykker.

Kontrol af indvirkning på farvbarhed: Nyre, lever og rygmarv fra 3 marsvin, hvor de to er intravitalt fixerede med Susa, medens det tredie er fixeret med Kaformacet (20. 8. 46). Fra kaformacetdyret er nyrevævet fjernet til kontrol af fixationens bonitet. Iøvrigt er fjernet medulla spinalis til sammenlignende Nissl-undersøgelser med den susa-fixerede medulla spinalis. Vævene er ikke afsublimerede, for herved at undgå eventuelle yderligere fejlkilder ved farvebedømmelserne. Knoglevævets og vævsstykkernes anbringelse i syre, og skiftningen af denne som sædvanlig. Bestemmelse af afkalkningen ved stikke-skæremetoden. Efter afkalkning anbragtes præparaterne direkte i rindende vand i 24 timer til fjernelse af syrerne. Afvanding, indlejring og skæring. Farvning med *Carazzis* hæmatoxylin, *Regaud-Haidenhain* hæmatoxylin og *Einarsons* gallocyaninkromalunlak.

Syreart og styrke	Afkalkningens slutpunkt	Afkalkningstid
HNO_3, 5 %	Afsluttet 1.9. kl. 0930	ca. 17 timer
HCl, 5 %	— 1.9. kl. 0930	ca. 17 timer
H_2SO_3, 6 %	— 2.9. kl. 0930	ca. 41 timer
H_2SO_4, 5 %	Ikke afsluttet 9.9.	over 9 døgn
CCl_3COOH, 5 %	Afsluttet 2.9. kl. 1230	ca. 44 timer
$C_6H_8O_7,H_2O$, 10 %	— 4.9. kl. 2130	ca. 4 døgn
$C_2H_4OHCOOH$, 10 %	— 4.9. kl. 2130	ca. 4 døgn
HCOOH, 10 %	— 1.9. kl. 1830	ca. 30 timer
HNO_3-formol	— 1.9. kl. 1330	ca. 21 timer
HNO_3-kromsyre	— 1.9. kl. 0930	ca. 17 timer
HNO_3-citrat (Sørensen)	— 9.9. kl. 0800	ca. 9 døgn

NB. Der er lagt 1 time på afkalkningstiderne på grund af sommertidens ophør.

MODELFORSØG NO. V

(Påbegyndt 15.10.46 kl. 1600)
(Undersøgelse af afkalkningstid og vævsfarvbarhed efter påvirkning med syrer)

Knoglemodel: De sædvanlige ribbensstykker.

Kontrol af indvirkning på farvbarheden: Nyre, lever og rygmarv fra det tilsyneladende bedst fixerede af 2 marsvin, som 8. 10. 46 blev intravitalt fixerede med *Carnoy-Lebruns* vædske. Fixationen forløb meget hurtigt, idet dyrene blev stive umiddelbart, efter at vædskerne var begyndt at løbe ind. Det foreløbige indtryk af fixationshastigheden bliver, at *Carnoy* er den hurtigst fixerende vædske, derefter kommer Kaformacet og til sidst Susa. *Carnoy* får dog gummisaltvandet til at blive mælket. Ribbensstykkerne og vævstykkerne anbringes som sædvanligt efter hærdn. og skyln. i vand i 100 cc. syre, der skiftes daglig. Afkalkningen kontrolleres ved stikke-skæremetoden. Efter afkalkning skylning af vævene i rindende vand i 24 timer, afvanding, indlejring, skæring og farvning med *Carazzis* hæmatoxylin, *Haidenhain-Regaud* hæmatoxylin og *Einarsons* gallocyaninkromalunlak.

Syreart og styrke	Afkalkningens slutpunkt	Afkalkningstid
HNO_3, 5 %	Afsluttet 16.10. kl. 0700	ca. 15 timer
HCl, 5 %	— 16.10. kl. 0700	ca. 15 timer
H_2SO_4, 5 %	Ikke afsluttet 24.10.	mere end 8 dage
H_2SO_3, 5 %	Afsluttet 16.10. kl. 1800	ca. 26 timer
HNO_3-citrat (Sørensen)	— 22.10. kl. 1600	ca. 1 uge
CCl_3COOH, 5 %	— 17.10. kl. 0700	ca. 39 timer
$C_6H_8O_7,H_2O$, 10 %	— 18.10. kl. 1600	ca. 3 døgn
$C_2H_4OHCOOH$, 10 %	— 18.10. kl. 1600	ca. 3 døgn
HCOOH, 10 %	— 16.10. kl. 1800	ca. 26 timer

Selv efter 1 års forløb ses der ingen afkalkende effekt af *Carnoys* vædske, og dette til trods for, at vædsken har en ikke ringe surhedsgrad (pH = 1.8).

FORSØG NO. VI

(Fixationsforsøg)

(27.11.46)

(Undersøgelse af kernefarvningen og specielt farvningen af Nissl-substansen)

Til forsøget anvendtes 3 marsvin, hvoraf de to blev intravitalt fixerede med Carnoy II, og eet blev fixeret med Carnoy I (begge dyr i æternarkose). Efterfixation i 1 time, og 1 døgn. Der anvendtes lever, nyre og rygmarv til undersøgelse af farvbarheden med *Carazzis* og *Haidenhain-Regauds* hæmatoxyliner samt med *Einarsons* gallocyaninkromalunlak. Resten af vævene tillige med labyrintherne blev efter hærdning opbevaret i 70% alkohol til eventuelle senere forsøg.

Carnoy-Lebrun: 1 del iseddike, 2 dele kloroform, 3 dele abs. alkohol : 33% iseddike.

Carnoy I: 1 del iseddike, 3 dele abs. alkohol : 25% iseddike.

Carnoy II: 1 del iseddike, 3 dele kloroform, 6 dele abs. alkohol : 10% iseddike.

Kaformacet: 425 cc. 5% kaliumdikromat, 50 cc. 40% formol, 25 cc. iseddike, 500 cc. destilleret vand : 2.5% iseddike.

FORSØG NO. VII

(Fixationsforsøg)

(14.2. og 6.3.47)

(Undersøgelse af kernefarvningen og Nissl-farvningen i samtidigt farvede præparater)

14. 2. 47: 2 marsvin gennemskyllet intravitalt i æternarkose med en blanding af kaliumbikromat, iseddike og alkohol *(Kromisal)*. Der udtages nyrer, lever og rygmarv og tindingeben. Fixationen af dyr no. II er bedst.

6. 3. 47: 2 marsvin gennemskyllet intravitalt i æternarkose med Kaformacet. Organerne stærkt gule. Fixationen udmærket.

2 marsvin intravitalt fixeret med Susa. Fixationen udmærket, som sædvanlig bedst af nyre og centralnervesystemet. Leveren fixeres langsommere (hører til portagebetet).

1 marsvin intravitalt fixeret i æternarkose med sublimatalkohol. Fixationen er meget fin, også af lever.

2 marsvin intravitalt fixeret i æternarkose ved gennemskylning med Carnoy II. Det sidste dyr er det bedst fixerede.

1 marsvin postmortelt fixeret med 10% formol (Gennemskylningen lykkes ikke, da der under indførelsen af glaskanylen kommer udrivning af aorta ascendens).

Der fjernes fra samtlige dyr nyre, lever og rygmarv, samt tindingeben, idet dog kun de bedste fra hver gruppe anvendes til farvningsforsøgene. Der efterfixeres for alle organers vedkommende i 1 døgn. Afvanding, indlejring, skæring og farvning med *Carazzis* og *Regaud-Haidenhains* hæmatoxyliner og *Einarsons* gallocyanin.

Fixationsgennemskylningen 14. 2. 47 var forudgået af forsøg på fremstilling af en iseddike-alkoholisk blanding uden de for Carnoyvædskerne uheldige

egenskaber overfor Nissl-substansen og uden disse vædskers øjensynligt koagulerende virkning på gummisaltvandet. En sådan udfældning fandt sted ved anvendelse af alkohol af større styrke end 60 %.

Kaliumdikromat og iseddike tilsat alkohol blev meget hurtigt grønt under moderat varmeudvikling, øjensynligt en følge af, at kromaterne ved reduktion i den sure vædske omdannedes til kromi-forbindelser. Alkohol + iseddike tilsat 5% kaliumdikromat gav udfældning af kromater (gult, fnugget bundfald), men disse viste sig at være letopløselige ved tilsætning af destilleret vand i en mængde svarende til 5% af den samlede mængde opløsning.

Sammensætningen blev da: Abs. alkohol ..... 600 cc.
ren iseddike ..... 50 cc.
hertil sættes kaliumdikromat, 5% ..... 350 cc.
hvorved der kommer gult bundfald, der opløses med aq. dest. ..... 50 cc.
(pH af denne vædske ca. 4.0).

I denne vædske (Kromisal) er iseddiken ca. 5%, alkoholen ca. 60% og kaliumdikromat ca. 2% (Iseddike-alkohol er tilsat af hensyn til Nissl-fixationen- og farvningen, kaliumdikromat af hensyn til kernefarvningen samt for at kunne skelne de to gennemskylningsvædsker (gummisaltvand og fixativ) fra hinanden. Endelig skulle alkohol i en styrke af ca. 60% være et godt fixativ i sig selv.

Sammensætningen af Susa:

Sublimat	gr. 45
Natriumklorid	gr. 5
Vand	cc. 800
Trikloreddikesyre	gr. 40
Formol (40%)	cc. 200

Fixationstid: 12 timer.

Sammensætningen af sublimat-alkohol:
(v. Apathy)

Sublimat	gr. 3
Natriumklorid	gr. 0,5
50% alkohol	cc. 100

Fixationstid: 12–24 timer.

Fixationstid for Kaformacet: ca. 12 timer.
Fixationstid for Carnoy-blandingerne: omkring 6 timer.
(Man får af ovennævnte fixationstider et indtryk af, hvor hurtigt de forskellige fixationsvædsker diffunderer).

RØNTGENFORSØG NO. I

(11.7.47 kl. 1030)

I dette forsøg drejer det sig om at bestemme afkalkningstiderne for forskellige, ikke brugte, *2 normale syrer ved stuetemperatur* (19° C.). Desuden undersøges den påfølgende farvbarhed af kerner og Nissl-substans med gallocyanin.

Knoglemodel: 2 mm tykke knogleplader af 7.5 mm diameter.
Farvekontrol: Frisk formolfixerede og objektglasmonterede snit af kalverygmarv samt 20 my tykke snit af histologisk præpareret kernecentrifugat, ligeledes monterede på objektglas.

Ved forsøgets begyndelse foretoges en bestemmelse af pH i alle syrerne (se pH-tabel side 234–35).

Dernæst anbragtes kerne- og rygmarvsobjektglassene tillige med de trådophængte knogleplader i 80 cc. af de forskellige syrer, der ikke skiftedes under den tid, forsøget stod på.

Der foretoges hyppig rtg-kontrol af kalkningen, ligesom pH jævnligt blev kontrolleret.

Ved det første forsøg af denne art, tog proceduren: At tage knoglepladerne til røntgenfotografering, at få dem fotograferet og at bringe dem tilbage igen, et kvarter. Da knoglepladerne under dette var i vand (af hensyn til røntgenfilmene, der vilde blive ødelagt af de ret stærke syrer) måtte denne tid trækkes fra den endelige afkalkningstid (se tabel over røntgensforsøg no I).

Når afkalkningen var færdig, blev kerne- og rygmarvspræparaterne anbragt i rindende vand i 24 timer. Derpå gallocyaninfarvning i 24 timer. Skylning i destilleret vand, afvanding, montering med balsam og dækglas.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (Pulrichs fotometer) (se fotometertabel I side 177).

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

(Tavle over røntgenforsøg I side 244–45).

RØNTGENFORSØG NO. II

(15.7.47 kl. 1100)

Forsøget går ud på at bestemme afkalkningstiden for forskellige, ikke brugte, *1 normale syrer ved stuetemperatur* (20° C.), i forbindelse med en undersøgelse af den efterfølgende farvbarhed af kerner og Nissl-substans med gallocyanin.

Knoglemodel: Se foregående forsøg.

Farvekontrol: Se foregående forsøg.

Ved forsøgets begyndelse foretoges bestemmelse af pH i samtlige syrer (se pH-tabel II), og under forsøget foretoges jævnlig kontrol af pH (se tavlen side 236–37).

Anbringelse af farvekontroller og knoglemodel som i foregående forsøg.

Jævnlig kontrolfotografering af knoglepladerne. Der var nu indarbejdet en vis rutine, så knoglepladerne nu kun var 10 minutter i vand for hver fotografering. Der blev derfor ved den endelige tidsopgørelse (se røntgenforsøgstabel no. I) kun trukket 10 minutter fra for hver gang, knoglepladerne er fotograferede. Dette gælder også for de resterende forsøg.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri med Pulfrichs fotometer (se fotometer-tabel II side 178), idet præparaterne forinden er skyllet i rindende vand i 24 timer og er blevet farvet med gallocyanin.

(Tavle over røntgenforsøg II, side 244–45).

RØNTGENFORSØG NO. III

(19.7.47 kl. 1000)

24 knogleplader i 600 cc. 1 n HNO_3, udtaget med et kvarters mellemrum og overført til rindende vand med påfølgende fotografering 21. 7. 47 kl. 0800.

Røntgenforsøget måtte senere gøres om, fordi det første billede var blevet for mørkt.

Hensigten var ved hjælp af en bestemmelse af knoglepladernes aftagende evne til at give skygge på røntgen (stigende intensitet af sværtningen) sammenholdt med en bestemmelse af det absolutte indhold af Ca i de tilsvarende knoglepladers at *bruge denne røntgenfilm som målestok for Ca-indholdet* i alle de film, der optoges under efterfølgende afkalkningsforsøg.

Dette er nøjere omtalt i texten (side 68).

RØNTGENFORSØG NO. IV

(24.7.47 kl. 0800)

Forsøget går ud på at bestemme afkalkningstiden for *brugte 2 normale syrer* sammenholdt med kerne- og Nissl-farvningen (med gallocyanin) efter afkalkning. Forsøget foretoges ved stuetemperatur (22° C.) og der anvendtes de samme syrer som i Røntgenforsøg no. I.

Knoglemodel: Som i røntgenforsøg I.

Farvekontrol: Som i røntgenforsøg no. I.

pH-kontrol med jævnlige mellemrum (se pH-tabel IV side 238–39).

Jævnlig kontrol af knoglepladernes afkalkning.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometer-tabel IV side 177). (Præparaterne skylledes efter endt afkalkning i rindende vand i 24 timer).

(Tavle over røntgenforsøg no. IV, side 246–47).

RØNTGENFORSØG NO. V

(28.7.47 kl. 0800)

Opgave: Bestemmelse af afkalkningstid for *brugte 1 normale syrer ved stuetemperatur* (23° C.) i forbindelse med undersøgelse af gallocyaninfarvningen af kerner og Nissl-substans efter afkalkning. Brugte syrer fra røntgenforsøg no. II anvendtes.

Knoglemodel: Som i foregående forsøg.

Farvekontroller: Som i foregående forsøg.

pH-kontrol med jævnlige mellemrum (se pH-tabel no. V side 240–41).

Røntgenkontrol: med jævnlige mellemrum.

Efter endt afkalkning skylledes præparaterne i rindende vand i 24 timer, afskylledes i destilleret vand, farvedes med gallocyanin i 24 timer, skylledes atter i destilleret vand, afvandedes og monteredes.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometertabel V side 178).

(Tavle over røntgenforsøg V, side 246–47).

RØNTGENFORSØG NO. VI

(31.7.47 kl. 0800)

Opgave: At belyse relationen mellem pH, kerne-Nissl-farvning og afkalkning.

Knoglemodel: De sædvanlige knogleplader.

Farvekontroller: De sædvanlige kerne- og rygmarvspræparater.

Forsøget står på 1 uge, hvorefter alle knoglepladerne bliver røntgenfotograferet på samme plade til bestemmelse af afkalkningsgraden. Kerne- og rygmarvspræparaterne skylles 24 timer i rindende vand, afskylles i destilleret vand og farves med gallocyanin til bestemmelse af farveresultatet. Der anvendtes følgende blandinger af HCl og citrat:

pH	cc. HCl	cc. Sørensens citrat
0	100 1 n	0
0.5	50 1 n	50
1.0	100 1/10 n	0
1.5	78 —	22
2.0	69 —	31
2.5	65 —	35
3.0	60 —	40
3.5	52 —	48
4.0	44 —	56
4.5	28 —	72

Der foretoges daglig kontrol af pH af vædskerne for at sikre den samme pH under hele forsøget. Hvis der blot var antydning af stigning i pH (0.1) udskiftedes vædskerne.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometer-tabel VI side 178).

(Tavle over afkalkningstiden i røntgenforsøg VI, side 171).

pH i forhold til Nissl-farvningen i kalverygmarv med gallocyanin.

pH : 0 Man ser et billede, hvor intet er farvet.

pH : 0.5 Man kan begynde at se tegning i ependymcellerne, ligesom ganglie-cellerne kan ses som meget svagt gråblå, uregelmæssige dannelser uden nogen indre tegning.

pH : 1 Der ses helt god tegning af ependymceller, gliacellekerner, kernepletter og Nissl-substans.

pH : 1.5 viser kun ringe merfarvning i forhold til foregående, således at det største spring i farveforskel findes imellem pH 1—0.5.

pH-værdierne 2 og opefter (4.5) viser ingen forskelle af betydning.

For at få optimal farvning af kromatin og kromatoide substanser, bør man altså ikke arbejde med vædsker med pH under 2.0, selv om man kan få anvendelige resultater ned til pH = 1, afhængig af den tid, præparatet udsættes for syrepåvirkningen (se tidsfaktorens betydning ved kernefarvningen efter varierende tids udsættelse for 1 normale syrer (myresyre, salpetersyre, saltsyre)), fig. 8 side 115.

(Afkalkning i forhold til varierende pH).
(Bestemmelse af området for effektiv afkalkning)

pH	Afkalkningsvædske			Afkalkningstid
0	1 n HCl			5 timer
0.5	1/3 n HCl			10 timer
	1:10 n HCl			
1.0	100	—	+ 0 citrat	25 timer
1.5	78	—	+ 22 —	6 døgn
2.0	69	—	+ 31 —	>7 døgn
2.5	65	—	+ 35 —	
3.0	60	—	+ 40 —	Efter over 7 døgn ses kun
3.5	52	—	+ 48 —	ringe randafsmalning i
4.0	44	—	+ 56 —	aftagende grad
4.5	28	—	+ 72 —	

Sammenlign forholdene i røntgenforsøg no. IX og XIII (organiske syrer), som viser helt andre forhold mellem pH og den afkalkende evne på den ene side og pH og gallocyaninfarvningen på den anden side.

RØNTGENFORSØG NO. VII

(13.8.47 kl. 0800)

Opgave: Bestemmelse af *overafkalkningen* (syrepåvirkning ud over den for afkalkningen nødvendige tid (den dobbelte tid)) *ved 2 normale syrer af stuetemperatur* (23–24° C.) i forbindelse med bestemmelse af gallocyaninfarvning af kerner og Nissl-substans. Forsøget desuden kontrol på røntgenforsøg no. I i henseende til afkalkningstiderne.

Knoglemodeller: Som i røntgenforsøg I.
Farvekontroller: Som i røntgenforsøg I.

Der foretages ingen fortløbende kontrol af pH. Man indskrænker sig til at måle slutnings- og begyndelses-pH.

Ligeledes er der kun foretaget røntgenkontrol omkring de tidspunkter, hvor forsøg I viste, afkalkningen skulle være fuldbyrdet. Dog særlig hensyntagen til at få fastlagt afkalkningstiderne for CH_3COOH, $C_6H_8O_7$, H_2O og CCl_3COOH.

Efter endt overafkalkning skylning af præparaterne i rindende vand i 24 timer, gallocyaninfarvning, montering.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.
Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometer-tavle VII side 177).
(Tavle over røntgenforsøg VII side 248–49).

RØNTGENFORSØG NO. VIII

(18.8.47 kl. 0800)

Opgave: Bestemmelse af *overafkalkning efter anvendelse af 1 normale syrer ved stuetemperatur* (23–22° C.). Bestemmelserne foretoges i forbindelse med under-

søgelse af gallocyaninfarvede kerne- og rygmarvspræparater. Iøvrigt tjente forsøget som kontrol af afkalkningstiderne i røntgenforsøg no. II.

Knoglemodel: Som i foregående forsøg.

Farvekontroller: Som i foregående forsøg.

pH-kontrol foretages kun ved forsøgets begyndelse og afslutning.

Røntgenkontrol foretages kun, når det skønnes nødvendigt af hensyn til kontrol med afkalkningens slutpunkt.

Efter endt overafkalkning skylning af præparaterne i rindende vand i 24 timer, gallocyaninfarvning og montering.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometer-tabel VIII side 178).

(Tavle over røntgenforsøg VIII side 248–49).

RØNTGENFORSØG NO. IX

(25.8.47 kl. 0800)

Opgave: Formålet er at undersøge, i hvilken styrke myresyre afkalker hurtigst, og at sammenligne dette med hastighed og farvbarhed for myresyre-citrat og myresyre-formiat. Yderligere er det hensigten at undersøge samme forhold for salpetersyreblandinger (1 normale med hensyn til syren og indeholdende tilsætning i det sædvanligt anvendte forhold (5% formalin — floroglucin — 96% alkohol)) samt for myresyrealkohol (myresyre, concentreret + 70% alkohol, lige dele).

Knoglemodeller: De sædvanligt anvendte.

Farvekontroller: De sædvanligt anvendte kernemodelpræparater og præparater med formolfixeret kalverygmarv.

Der foretages kun delvis kontrol af pH (se pH-tavle no. IX side 242–43).

Der er foretaget fortløbende røntgenkontrol af knoglepladerne for at kunne bestemme afkalkningens forløb.

Kernepræparaterne i 85% myresyre ødelægges fuldstændigt.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometertavle IX side 178).

(Tavle over røntgenforsøg no. IX side 250–51).

RØNTGENFORSØG NO. X

(1.9.47 kl. 0800)

Opgave: Undersøgelse af afkalkningshastighed for 1/10 normale syrer og farvbarhed af kontrolvævene.

Knoglemodeller: Som foregående forsøg.

Farvekontroller: Som foregående forsøg.

Kontrol af pH: Foretages fortløbende (se pH-tavlen no. X), idet man netop i dette forsøg venter stigninger i pH, især for de svagere syrers vedkommende. pH er iøvrigt en enkelt dag (3. 9. 47) ejendommeligt svingende, men tallene er

hver gang dobbelt kontrollerede, ligesom pH-app. er justeret i tilslutning til hver måling (se side 242–43).

Kontrol af afkalkningen: Der er foretaget talrige røntgenoptagelser, flest den første forsøgsdag, de følgende par dage kun 2 gange, og derefter kun 1 gang i døgnet.

Eddikesyre og citronsyre må afbrydes, da pH er steget maximalt og der ikke længere finder nogen afkalkning sted (efter 12 dages forløb).

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometer-tavle X side 179).

(Tavle over røntgenforsøg no. X side 250–51).

RØNTGENFORSØG NO. XI

(2.9.47 kl. 0800)

Opgave: Bestemmelse af afkalkningstid — og forløb samt den påfølgende farvning ved anvendelse af 1 normale syrer ved 33°. Vædskerne har stået i thermostaten tillige med vævssnittene stående i vand, for at temperaturen kunne være den rette ved forsøgets begyndelse. Temperaturen holdt sig hele tiden konstant på 33° C. (*Bangs* thermostat).

Knoglemodeller og farvekontroller: De sædvanlige.

pH-kontrol: Kun foretaget ved forsøgets begyndelse og afslutning.

Røntgenkontrol: Foretaget fortløbende for at bestemme afkalkningens forløb. Foretages hyppigere den første dag, derefter med større mellemrum indtil 1 døgn.

Efter skylning i rindende vand i 24 timer og afskylning af præparaterne i destilleret vand, farvning i gallocyanin.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.

Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometertavle XI, side 179).

(Tavle over røntgenforsøg no. XI, side 252–53).

RØNTGENFORSØG NO. XII

(9.9.47 kl. 0800)

Opgave: Ved anvendelse af den sædvanlige syrerække er det formålet at bestemme indflydelsen af en temperatur på 4° C. på afkalkning og gallocyaninfarvning. Præparaterne står i isskab på afd. A.s laboratorium ved en temperatur på ca. 4–5° C. Ved røntgenfotograferingerne foregår skiftningen af knoglepladerne til præparatglas indeholdende vand af samme lave temperatur.

Knoglemodeller og kerne- samt rygmarvsmodeller: De sædvanligt anvendte.

pH-kontrol: Kun foretaget ved forsøgets begyndelse og afslutning.

Røntgenkontrol: Foretaget fortløbende, den første dag hver 2. time, derefter med større mellemrum indtil 1 døgn.

Temperaturen 10.9. steget en anelse, da der ved fejltagelse var afbrudt for strømmen til motoren.

Ved forsøgets afslutning skylning af vævskontroller i rindende vand, afskylning i destilleret vand og farvning i gallocyanin.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.
Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometertavle XII, side 179).

(Tavle over røntgenforsøg no. XII, side 252–53).

RØNTGENFORSØG NO. XIII

(23.9.47 kl. 0800)

På basis af et forsøg (5.8.47) med en blanding af 60 cc. 2 n HCOOH + 30 cc. 1 n HCOONa med pH 2.85 (mv 205) og på basis af resultatet i røntgenforsøg no. IX (myresyreformiatblandingen) fremstilles en serie myresyre-formiatblandinger for at finde en blanding med optimal afkalkningshastighed og minimal vævsødelæggende virkning (maximal pH).

Der er anvendt følgende blandinger:

	cc. HCOOH	cc. HCOONa	Blandingsforhold	pH
1	30 n1 (ca. 5%)	60 n 1	1:2	3.8
2	40 –	40 –	1:1	3.5
3	60 –	30 –	2:1	3.2
4	30 n 2 (ca. 10%)	60 –	1:2	3.35
5	40 –	40 –	1:1	3.25
6	60 –	30 –	2:1	2.85
7	30 n 4 (ca. 20%)	60 –	1:2	3.0
8	40 –	40 –	1:1	2.7
9	60 –	30 –	2:1	2.3
10	40 n 8 (ca. 40%)	40 –	1:1	2.2

Knoglemodeller: De sædvanligt anvendte.
Farvekontroller: De sædvanligt anvendte.

pH-kontrol: Foretages kun ved forsøgets begyndelse og afslutning og viser sig at være praktisk talt uændret, som et udtryk for en god stødpudevirkning (de ændringer, der er tale om, kan være fejlvisninger i apparatet).

Røntgenkontrol: Foretages fortløbende for at lære forløbet af afkalkningen at kende.

Alle præparater er fastsiddende. Knoglerne er uforandret hvide og uigennemskinnelige og lette at skære.

Efter afkalkningens afslutning skylles objektglaspræparaterne som sædvanligt og farves med gallocyanin.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.
Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometertavle no. XIII, side 179).

(Tavle over røntgenforsøg no. XIII, side 254–55).

RØNTGENFORSØG NO. XIV

(8.10.47 kl. 0800)

Opgave: Bestemmelse af overafkalkning (afkalkning i det dobbelte af den nødvendige tid) ved blandingerne 5–10. Forsøg på bestemmelse af en eventuel vævsbeskyttende egenskab hos Lanthan (se *Hamberger & Hyden*). Til sidstnævnte formål er der fremstillet en ren 3 n iseddike, og en 3 n iseddike, der er 0.05 molær med hensyn til lanthanacetat; desuden en 3 n salpetersyre, som er 0.05 molær med hensyn til lanthannitrat, og endelig en 3 n salpetersyre for at se, hvor stor den vævsbeskyttende effekt er i forholdet ren syre — syre + tilsvarende lanthansalt.

Knoglemodeller og farvekontroller: De sædvanlige.
pH-kontrol: Ved forsøgets begyndelse og afslutning.
Røntgenkontrol: Når det er fundet nødvendigt.

Den 11.11.47 var knoglepladen i lanthanacetat-iseddikesyren endnu ikke antydningsvis afkalket!

Ved forsøgets afslutning skylning af objektglaspræparaterne i rindende vand og i destilleret vand med efterfølgende farvning med gallocyanin i 24 timer.

Bestemmelse af Nissl-farvningen: Sammenligningsmikroskopi.
Bestemmelse af kernefarvningen: Fotometri (se fotometertavle XIV, side 180).

Da lanthanacetat-iseddikesyren var uvirksom, var det hensigten at forsøge med lanthanformiat. Præparatet var ikke til at skaffe. »Struer« turde ikke påtage sig at fremstille det af lanthanacetat. Jeg forsøgte derfor selv at fremstille det ved at opløse lanthanacetat i natriumhydroxyd. Derefter udfældedes ved tilsætning af myresyre lanthanformiat. Imidlertid dannedes en gel, der ikke kunne dekanteres. Forsøget måtte opgives.

(Tavle over røntgenforsøg XIV, side 254–55).

TIDSFAKTOREN CONTRA KERNEFARVNINGEN

(18.8.47 kl. 0800)

Opgave: Bestemmelse af kernefarvningen fotometrisk efter farvning a. m. *Einarson* med gallocyanin, efter at ensartede kernepræparater har været udsat for lige store mængder 1 normal saltsyre, salpetersyre og myresyre i stigende tid for at se, hvor stor rolle tiden spiller ved syrepåvirkningen.

Knoglemodeller: Er ikke anvendt.
Farvekontroller: Specielt fremstillede kerneudtræk fra milt, der efter at være centrifugeret til en fast vævsprop er skåret i 20 my tykke snit og monteret på objektglas.

Der er anbragt ialt 10 kernepræparatglas i hver af de tre beholdere med syre. Der fjernes eet præparat fra hver af syrebeholderne på følgende tider.

18.8.47 kl. 0830	½ time
18.8.47 – 0900	1 time
18.8.47 – 1000	2 timer
18.8.47 – 1200	4 timer

18.8.47 – 1600 ..... 8 timer
18.8.47 – 2400 ..... 16 timer
19.8.47 – 1600 ..... 32 timer
20.8.47 – 2400 ..... 64 timer
22.8.47 – 1600 ..... 128 timer
27.8.47 – 2400 ..... 256 timer

hvorefter præparaterne skylles i rindende vand i 24 timer, afskylles i destilleret vand og farves med *Einarsons* gallocyanin. Aflæsning med Pulfrichs fotometer.

Tabel over kernefarvning ctr. tidsfaktor (fig. 8, side 115)

Fotometrisk bestemmelse af kernefarvningen a. m. Einarson efter udsættelse af ensartede kernepræparater for lige store mængder 1 normal salt- salpeter- og myresyre, i stigende tid (*tidsfaktorens* forhold ved rene syrer ctr. kernepræparater)

No.	Tid (timer)	Saltsyre			Salpetersyre			Myresyre		
		Fotometer	Middel	Absorpt	Fotometer	Middel	Absorpt	Fotometer	Middel	Absorpt
1	½	15 15	15	85	15 11	13	87	9 10	9,5	90,5
2	1	15 16	15,5	84,5	14 18	16	84	10 10	10	90
3	2	20 21	20,5	79,5	18 14	16	84	11 12	11,5	88,5
4	4	25 26	25,5	74,5	22 23	22,5	77,5	12 14	13	87
5	8	30 30	30	70	29 31	30	70	14 14	14	86
6	16	35 32	33.5	66.5	40 40	40	60	15 13	14	86
7	32	52 52	52	48	59 54	56.5	43.5	16 16	16	84
8	64	65 66	65.5	34.5	63 63	63	37	18 16	17	83
9	128	75 72	73.5	26.5	70 70	70	30	18 18	18	82
10	256	80 78	79	21	76 79	77.5	22.5	19 21	20	80

(Udelukkende kernefarvningsforsøg, ingen samtidig afkalkning).

Fotometerkontrol I

Fotometrisk undersøgelse af forskellige forhold af interesse i forbindelse med undersøgelse af ændringer i kernefarvningsintensiteten. (Pulfrich fotometer, filter no. X).

Udstrygningspræparat af kerner fra milt	45
Kromatinpapir, ufarvet	8
— , gallocyaninfarvet	3
— , — efter HNO_3	5
Vandklart objektglas, tyndt	89
— — , tykt	88
Grønt — , tysk dækglas	86
— — , engelsk dækglas	86
Ufarvet kernepræparat	67
— — , beh. m. HNO_3	79
Farvet kontrolpræparat (gallocyanin)	11

Fotometerkontrol II

Diverse fotometriske farvekontrolundersøgelser (kontrol af Einarsons gallocyanin og af kernepræparater).

		Middeltal
Gallocyanin (18.9.47) anv. 27. 9.	11—11	11
— — – 2.10.	11—11	11
— — – 9.10.	11—	11
— — – 16.10.	11—	11
— — – 23.10.	16—16 (over 4 uger)	16
Gallocyaninkontrol (9.10.)		
— I.....	13	13
— II.....	11—11	11
— III.....	12	12
Gallocyaninkontrol (17.7.)	11—12	11.5
Nyt præp. – ny farve 26.9.....	13—13	13
Nyt præp. – do. farve 25.9.....	10—12	11
Andet præp. do. farve 25.9.....	11— 9	12
Kontrol 27.9.....	12—12	12
(De sidste tre præp. farvet med gallocyanin fra 24.9.47).		
Gallocyaninfarvning efter at præparatet har været udsat for almindeligt vand i 14 dage.....	4 NB.	

Fotometertavle I - IV - VII

Fotometrisk bestemmelse af kernefarvningen a. m. Einarson i kernepræparater, der har været udsat for 2 normale syrer under forskellige forsøgsbetingelser (brugte og ubrugte syrer — overafkalkning). (Svarer til røntgenforsøg No. I, IV og VII).

Syrer	Ubrugte 2 normale syrer		Brugte 2 normale syrer		Overafkalkning med 2 normale syrer	
	Fotometerværdi	Middel	Fotometerværdi	Middel	Fotometerværdi	Middel
HNO_3	18—18	18	31—30	30.5	32—32	32
HCl	22—21	21.5	40—42	41	43—46	44.5
H_2SO_3	10— 9	9.5	15—17	16	22—23	22.5
H_3PO_4	12—12	12	13—12	12.5	14—12	13
H_2CrO_4	48—52	50	47—47	47	63—62	62.5
HCOOH	7— 8	7.5	8— 7	7.5	10— 8	9
CH_3COOH	15—15	15	6— 9	7.5	12—12	12
CCl_3COOH	40—43	41.5	40—40	40	43—41	42
$C_2H_4OHCOOH$	12—11	11.5	11—	11	11—11	11
$C_6H_8O_7,H_2O$	16—18	17	7— 8	7.5	27—27	27

Fotometertavle II - V - VIII

Fotometrisk bestemmelse af kernefarvningen a. m. Einarson i kernepræparater, der har været udsat for forskellige 1 normale syrer under varierende betingelser. (Pulfrich fotometerfilter X = S 66). (Svarer til røntgenforsøg no. II–V og VIII)

Syrer	1 normale syrer		1 normale brugte syrer		Overafkalkning med 1 normalsyrer	
	Fotometerværdi	Middel	Fotometerværdi	Middel	Fotometerværdi	Middel
HNO_3	14—12	13	15—14	14.5	26—26	26
HCl	13—15	14	18—17	17.5	32—32	32
H_2SO_3	8—10	9	10—11	10.5	31—33	32
H_3PO_4	14—13	13.5	9— 8	8.5	13—15	14
H_2CrO_4	50—51	50.5	40—42	41	64—60	62
HCOOH	7— 5	6	8— 6	7	10—12	11
CH_3COOH	11—12	11.5	10—10	10	16—19	17.5
CCl_3COOH	18—19	18.5	18—19	18.5	30—34	32
$C_2H_4OHCOOH$	10—13	11.5	10— 8	9	16—18	17
$C_6H_8O_7,H_2O$	19—15	17	5	5	Kerner ødel.	

Fotometertavle VI

Bestemmelse af kernefarvningen a. m. Einarson med Pulfrichs fotometer (filter no. X = S 66) efter afkalkningsforsøg med saltsyrecitratblandinger med pH fra 0 til 4.5 (Svarer til røntgenforsøg no. VI)

pH	Fotometerværdier	Middelværdi	Lysabsorption
0	68—66	67	33
0.5	39—40	39.5	60.5
1.0	14—16	15	85
1.5	12—11	11.5	87.5
2.0	10—10	10	90
2.5	8—10	9	91
3.0	9—11	10	90
3.5	11—11	11	89
4.0	12—11	11.5	88.5
4.5	15—12	13.5	86.5

Fotometertavle IX

Fotometrisk bestemmelse af kernefarvningen a. m. Einarson efter afkalkningsforsøg med forskellige koncentrationer af myresyre samt forskellige myresyre- og salpetersyreblandinger. (Fotometerfilter no. X = S 66). (Svarer til røntgenforsøg no. IX)

HCOOH, 10 %	9	11	10
— , 20 %	10	10	10
— , 40 %	18	20	19
— , concentreret	kernepræparater ødelagt		
HCOOH-citrat	26	26	26
— -formiat	10	10	10
— -alkohol	21	21	21

HNO_3-alkohol	47	49	48.
— -floroglucin	15	15	15
— -formol	19	19	19

Ovenstående salpetersyreopløsninger er 1 normale med hensyn til salpetersyre.

Fotometertavle XI - XII - X

Fotometrisk bestemmelse af kernefarvningen a. m. Einarson i kernepræparater, der har været udsat for forskellige syrer under varierende betingelser (1 normale syrer ved forskellig temperatur — 1 10 normale ved stuetemperatur). (Pulfrich fotometer med filter no. X = S 66). (Svarer til røntgenforsøgene no. XI, XII og X)

Syrer	1 n syrer v. 33° C.		1 n syrer v. 4° C.		1/10 n syrer v. stuetemperatur	
	Fotometerværdi	Middel	Fotometerværdi	Middel	Fotometerværdi	Middel
HNO_3	26—27	26.5	20—19	19.5	24—27	25.5
HCl	35—33	34	19—19	19	18—19	18.5
H_2SO_3	42—41	41.5	23—24	23.5	12—12	12
H_3PO_4	26—24	25	18—17	17.5	17—17	17
H_2CrO_4	54—56	55	40—41	40.5	45—47	46
HCOOH	13—14	13.5	18—19	18.5	15—13	14
CH_3COOH	26—22	24	14—12	13	23—19	21
CCl_3COOH	23—25	24	19—22	20.5	19—19	19
$C_2H_4OHCOOH$	11—11	11	17—14	15.5	15—12	13.5
$C_6H_8O_7,H_2O$	Kerner ødel.		15—17	16	17—18	17.5

Fotometertavle XIII

Fotometrisk bestemmelse af kernefarvningen a. m. Einarson efter afkalkningsforsøg med myresyre-natriumformiatblandinger 1–10. Bestemmelserne foretaget med filter no. X = S 66 (Svarer til røntgenforsøg no. XIII)

HCOOH-formiatblanding no. 1	5	6	5.5
— – 2	7	6	6.5
— – 3	8	8	8
HCOOH-formiatblanding no. 4	10	10	10
— – 5	10	8	9
— – 6	9	8	8.5
HCOOH-formiatblanding no. 7	10	10	10
— – 8	8	9	8.5
— – 9	10	9	9.5
HCOOH-formiatblanding no. 10	8	7	7.5

NB. De ret lave fotometertal nederst i hver gruppe samt i den nederste gruppe (svarer til relativt større mængder myresyre i stødpudeopløsningen).

Fotometertavle XIV

Fotometrisk bestemmelse af kernefarvningen a. m. Einarson efter afkalkningsforsøg med 3 n salpeter- og eddikesyre (rene og tilsat det tilsvarende lanthansalt, så opl. er 0.05 m) og efter overafkalkningsforsøg med myresyre-natriumformiatblandingerne 5–10.
(Svarer til røntgenforsøg no. XIV)

HNO_3 3 n	37	37	37
La-HNO_3	38	40	39
CH_3COOH, 3 n	6	6	6
La-CH_3COOH	4	5	4.5
HCOOH-formiat 5	9	10	9.5
— 6	8	8	8
— 7	10	9	9.5
— 8	9	10	9.5
— 9	10	8	9
— 10	12	10	11

FARVERESULTATER EFTER AFKALKNING

A: RIBBENSMODELFORSØG

Postmortel fixation (modelforsøg I)

Præparaterne er farvede med Bøhmers hæmatoxylin (gammel), Weigert-v. Gieson og Azur-Eosin.

Salpetersyre (5%): Afkalket i løbet af 22 timer, organer grønlige. Som helhed er vævet en del mere rødligt af tone end kontrolpræparatet. Det er ganske let skrumpet og noget uskarpt, specielt er kernekromatinet ikke så vel udtalt som i kontrolpræparatet. Dette gælder for hjerne, lever og nyrer.

Knoglemarven er nogenlunde vellykket, men bærer præg af syrepåvirkning i form af overvejen af rødlige farvetoner. Kerne- og kromatintegningen er uskarp.

Det samme gælder præparaterne farvede a. m. Weigert-v. Gieson. Dog er disse præparater vanskeligere at differentiere så ensartet over hele vævsstykket som Bøhmerhæmatoxylinpræparaterne.

Skrumpningen af vævene ses bedst i nyrepræparaterne ved formindsken af glomeruli. Iøvrigt skal bemærkes, at der er blod i alle karrene (ingen forudgående gennemskylning).

Differentieringen er vanskelig at gøre ensartet. Selv om man sammenligner afsnit i disse præparater, der er stærkere farvede end i kontrolpræparatet, falder resultatet af bedømmelsen ud til fordel for det ikke afkalkede præparat.

Saltsyre (5%): Afkalkning i løbet af 22 timer. Som helhed er præparaterne mere blålige i tonen end kontrolpræparatet, men ellers ses i Bøhmer-farvningen de samme ulemper som ovenfor omtalt. Det ser dog ud, som om saltsyren er mindre ødelæggende for farvningerne end salpetersyren.

Weigert-farvningen viser en udtalt forskel mellem kontrolpræparatet og det saltsyrebehandlede præparat. Medens protoplasmaet farves nogenlunde ens i begge præparater, findes i de saltsyrebehandlede præparater en udtalt nedsættelse af kromatinets farvbarhed i samtlige celler, særligt tydeligt i levervæv og hjernevæv.

Knoglemarven er enten stærkt blåt farvet eller helt affarvet uden mellemtoner.

Svovlsyrling: Afkalker i løbet af ca. 40 timer. Væv grønlige, lyse. Bøhmers hæmatoxylin: Levervævet er mere rødligt end kontrolpræparatet (mindre stærkt differentieret?). Nyre- og hjernevæv viser snarere det omvendte forhold, men samtidigt ses, at såvel kerner som kerne- og cellemembraner er veludtalte og næsten lige så gode som i kontrolpræparatet.

Weigert: Tonerne er mere rødlige og tegningen ikke helt så klar som i kontrolpræparatet. Afvigelserne fra kontrolpræparatet er ikke store. I forhold til saltsyre og salpetersyre er denne syre bedre, idet såvel tegning som farvbarhed er bedre.

Særligt udtalt findes dette i Weigert-præparaterne, men det ses også i de Bøhmer hæmatoxylin-farvede præparater.

Trikloreddikesyre: Afkalker på 3 døgn, væv grønlige og lyse. Såvel Bøhmer- som Weigertfarvningerne ligger meget nær kontrolpræparaterne, såvel tinktorielt som i henseende til klarhed. Tegningen i celle- og kernemembraner er særdeles tydelig, kromatinet er velbevaret. Trikloreddikesyrepræparatet er af et lidt bedre udseende end kontrolpræparaterne, bortset fra nogen skrumpning (formindskelse af kapselrummet i glomeruli).

Præparaterne står let mål med svovlsyrlingpræparaterne og er langt bedre end saltsyre- og salpetersyrepræparaterne.

Mælkesyre: Afkalker på 6 døgn, vævene næsten ufarvede. Ved begge farvninger ses en kraftigere farvning af vævene end hidtil set, idet samtidigt tegningen i alle strukturer er meget distinkt. Præparaterne er meget bedre end kontrolpræparaterne.

Citronsyre: Afkalker på samme tid som mælkesyre og affarver vævene som oven for beskrevet. Vævsfarvningerne er endnu kraftigere, især med Weigerts farvning.

Svovlsyre (5%): Er forbavsende lang tid om at afkalke (over 7 døgn). Vævene er svagt grønlige. Der viser sig ved begge farvninger en udtalt syrepåvirkning i form af stærkt afbleget, rødlig farvning med udslettelse af så godt som alle konturer. Der er praktisk taget ingen farvning af kernerne. Der findes ingen sikre skrumpninger af vævene. I det hele taget er vævsstrukturerne velbevarede; kun farvningen har lidt.

Kromsyre (2%): Er langsomt virkende (9 døgn). Vævene er stærkt gule med rødligt islæt. Der er kun fremstillet Bøhmer-præparater. Vævene er stærkt rødligt farvede. Der er overhovedet ingen kernetegning. I stedet ses tendens til konturering af cellemembranerne, særligt udtalt i nyrens tubuli, hvor ligeledes børstesømmen er meget kraftigt aftegnet (mulighed for anvendelse af kromsyren som forbehandling ved undersøgelse for børstesøm?). Hvad angår knoglemarvspræparater fra de afkalkede knogler, gør forhold som ovenfor beskrevet sig gældende: Bøhmerpræparaterne er bedst for trikloreddikesyrens vedkommende, næsten for gode for mælke- og citronsyren, ret gode for svovlsyrling, men dårligere for salt- og salpetersyre og dårligst for svovlsyrens vedkommende.

Azur-eosinfarvning a. m. *Maximow* er bedst for trikloreddikesyrens vedkommende. For salt- og salpetersyren gælder, at præparaterne enten er for blå eller for røde, medens trikloreddikesyren lettere giver hele toneregisteret fra rødt til blåt. Mælke- og citronsyre giver helt pæne præparater, som dog ikke kommer på højde med trikloreddikesyrepræparaterne. Svovlsyrlingen virker nogenlunde. Svovlsyren giver fuldstændigt ufarvede præparater.

MODELFORSØG II–V

Intravital fixation.

Ny Bøhmer hæmatoxylin-præparater: Præparaterne stammer fra 2. og 3. forsøgsrække, hvor fixationen i modsætning til det foregående forsøg er foretaget intravitalt (med Wittmaacks Kaformacet). Efterfixation 1 døgn i Kaformacet.

---

*) Ikke alle præparater findes i denne serie, idet den tilsyneladende dårlige farvemetode (Bøhmers hæmatoxylin) hurtigt blev forladt.

Kontrolpræparat: Hjerne, lever og nyre viser en meget dårlig farvning, så godt som uden kerne- eller protoplasmafarvning. Farven er bleg og udflydende i forbindelse med, at der er en del udfældninger (farve?). Kun i glomerulis slynger er der antydningsvis kernetegning.

Salpetersyre (5%): Afkalker på 22 timer. Præparaterne er syreprægede, rødlige med svag kernetegning.

I forhold hertil er *salpetersyre-citrat* (lige dele 10% opl.) mere skånsom, idet tonerne i præparatet er mere blålige. Kernetegningen er langt bedre udtalt, især i hjerne og nyre. Den afkalker på ca. 41 timer.

Salpetersyre-floroglucin: Afkalker på ca. 3 døgn, men præparaterne er meget slette, idet der kun ses cellemembraner og antydning af kernemembraner, men slet ingen kernetegning. Farvetoner lyst rødlige.

Salpetersyre-formalin: Afkalker på ca. 24 timer. Præparaterne er næsten lige så slette som floroglucinpræparaterne. Der findes dog nogen kernetegning. Cellemembrantegningen er det tydeligste. Der er talrige farveudfældninger.

Svovlsyrling (6%): Afkalker på ca. 46 timer. Der findes en del celle- og kernemembrantegning, ligeledes nogen kernetegning, men langt fra tilfredsstillende. Der er moderate farveudfældninger.

Saltsyre (5%): Afkalker på ca. 22 timer. Præparaterne er rødlige i tonen, kernetegningen er ikke så distinkt som i salpetersyrepræparaterne, og der er lidt flere farveudfældninger.

Saltsyre-natriumklorid: Afkalker på ca. 40 timer. Der er ikke så mange farveudfældninger som i saltsyrepræparatet, men der er til gengæld en meget dårligere kernefarvning. Tonen i disse præparater er mere rødlig end i de præparater, der har været udsat for den rene saltsyre. Kernetegningen er dårligst i nyre- og levervævet.

Kromsyre (5%): Afkalker på 3 døgn. Præparaterne ser kadaverøse ud med udtalt opblødning og opløsning af vævselementerne. Der er en svag protoplasmafarvning og slet ingen kernefarvning. Der findes rigelige farveudfældninger.

Svovlsyre (5%): Er mere end 1 uge om at afkalke. Præparaterne ligner meget kontrolpræparaterne. Måske er førstnævnte lidt mere rødlige og med lidt mere tegning i nyrens samlerør. Der er måske lidt færre farveudfældninger end i kontrolpræparaterne.

Trikloreddikesyren: Afkalker på 3 døgn. I præparatet, der er efterbehandlet med 96% alkohol ses kun nogenlunde kernetegning. Farvetonen lidt mere rødlig end i kontrolpræparaterne. Der ses næsten ingen farveudfældninger.

Trikloreddikesyre: Efterbehandling med natriumsulfat giver resultater, der i forbavsende grad afviger fra foregående, idet præparaterne bliver mere syreprægede, af stærkere rødlig farvetone i forbindelse med næsten manglende kernetegning.

Citronsyre (10%): Giver stærkt rødlige præparater, men kernefarvningen er noget bedre end i foregående præparater. Der findes udtalt cellemembrantegning. Præparaterne minder mest om præparater udsat for trikloreddikesyre og efterbehandlet med natriumsulfat, dog er tonen knap så rødlig og kernetegningen er tydeligere. Helt skarpe er billederne ikke. Den afkalker på 5 døgn.

Myresyre (10%): Giver kraftigt farvede billeder, med rigelig kromatintegning, uden at tegningen er så distinkt som ønskeligt. Der er rigelige farveudfældninger.

Den afkalker på ca. 46 timer (sammenlign den concentrerede myresyre, som tilsyneladende slet ikke afkalker!).

Langt klarere billeder med betydeligt mindre farveudfældninger opnås efter afkalkning med *myresyre-citrat*, (som afkalker i løbet af ca. 4 døgn). Præparaterne er ikke så lidt bedre end de med trikloreddikesyre behandlede præparater (uanset efterbehandlingen). I det hele taget har denne afkalkningsvædske tilladt fremstilling af de bedste og klareste billeder med færreste farveudfældninger.

Mælkesyre (10%): Afkalker på 7 døgn. Præparaterne er kraftigt farvede, men ikke særligt gode i differens mellem kerner og protoplasma, ligesom der findes en del udfældninger.

Regaud-Haidenhain-farvning.

Salpetersyre (5%):

Hjerne: Præparatet som helhed blegere end det almindelige kontrolpræparat. Kernerne er nogenlunde sværtede med nukleoli i gangliecellerne, hvorimod der ikke findes Nisslgranula nogetsteds. I kontrolpræparatet er Nisslgranula særdeles smukke og klare.

Nyre: Differentieringen af præparater, der er afkromerede a. m. Tsiminaki, er bedre, men ellers er de ikke afkromerede præparater pæne, ikke helt på højde med kontrolpræparaterne.

Lever: Sammenlignet med kontrolpræparatet ses svagere, blåsort farvning, i særdeleshed med svag kromatintegning. Det afkromerede præparat viser kraftigere blåsort farvning, især i kernernes kromatin, som tegner sig tydeligt.

Salpetersyre-alkohol:

Nyre: I forhold til det salpetersyrebehandlede præparat ses en mere grålig farvning af protoplasmaet, medens kernekromatinet er næsten ensartet. I forhold til kontrolpræparatet ses afblegning af protoplasmaet, mest udtalt i forhold til det afkromerede kontrolpræparat. Der er ikke større forskel på kernerne.

Hjerne: Neuroglia grålig, medens de øvrige strukturer, kerner og nukleoli, viser samme forhold som omtalt for salpetersyrens vedkommende.

Lever: Vævet er ikke helt uddifferentieret, og dog er de cellulære grænser meget skarpt tegnede. I forhold til kontrolpræparatet er der ikke større forskel i kernefarvningen. I forhold til salpetersyre-præparatet er kernetegningen noget svagere.

Kromsalpetersyre:

Hjerne: Præparatet præsenterer sig godt, men er dog mere blåligt og blegere end salpetersyrepræparatet, og det er ikke tilnærmelsesvis så godt som K. (= kontrolpræparatet) eller som T. (= kontrolpræparaterne, afkromerede a. m. Tsiminaki). Der findes som i de øvrige salpetersyrepræparater ikke Nisslgranula.

Nyre: Heller ikke disse præparater kommer på højde med K. og T., omend kerner, børstesøm og mitochondrier tilsyneladende er ganske pæne.

Lever: Der findes en del udfældninger, ligesom det fandtes i nyre og hjerne, men ellers er præparatet bedre i farvningen end det rene salpetersyrepræparat. Det er langt dårligere end K. og T.

Salpetersyre-citrat:

Hjerne: Der ses tydelige Nisslgranula. Gliavæv, kerner og nukleoli er smukke.

Lever: Kerner er smukke. Cellegrænser er fine.

Nyre: Kernerne er smukke, børstesøm og cellegrænser findes bedre end i K., og næsten lige så gode som i T. Der er overhovedet ingen udfældninger af farve, og farven er næsten af samme blå tone som i T.

Salpetersyre-floroglucin:

Hjerne: Der findes spor af Nisslgranula? Iøvrigt findes farvningen forbavsende god, når man erindrer udseendet af de bøhmerfarvede præparater. Kernerne er ikke helt gode, og farvningen er noget udflydende, sidstnævnte også gældende for nyre- og levervæv.

Nyre: Børstesømmen synes nogenlunde bevaret.

Lever: Farvningen blegere end det rene salpetersyrepræparat, og konturerne er lidt mere udflydende.

Salpetersyre-formalin: Samtlige præparater er mere blåt farvede end efter den rene salpetersyre. Strukturerne står klarere.

Hjerne: Der er hist og her farvning af Nisslgranula. Kerner og nukleoli er ganske pæne.

Nyre: Børstesømmen er flere steder ganske godt bevaret. Der er ingen sikker skrumpning af vævet.

Lever: Konturer er meget klare i form af smukke cellegrænser. Kernerne er smukke.

Svovlsyre: Samtlige præparater er meget blege, og dog ser man netop i disse præparater, hvor intenst farvende Regaud-Haidenhains hæmatoxylin er, idet de fleste strukturer er sværtede.

Hjerne: Ingen Nissl-farvning, til trods for at der findes flere, store, pæne ganglieceller. Kerner og nukleoli er meget afblegede. Marvtrådene er forbavsende pænt farvede (blå tone).

Nyre: Vævet er meget varierende differentieret i forskellige afsnit. Der ses forskelle i kernerne fra tubuli contorti af 1. og 2. orden, idet de dog som helhed er stærkt afblegede. Børstesøm ses næsten ikke, mitochondrier kun sporadisk.

Lever: Kernerne er så godt som ikke farvede. Cellegrænserne er meget skarpe. Svarende til protoplasmaets beliggenhed er der mange steder fuldstændigt tomt. Til gengæld er cellegrænser meget skarpe.

Kromsyre: Alle præparaternes vævsstrukturer har lidt, og der er rigeligt med udfældninger. Ellers er vævene tilsyneladende kraftigt farvede (makroskopisk).

Hjerne: Vævet er næsten strukturløst, kernerne er ufarvede. Nukleoli er stærkt sværtede, næsten sorte, men der ses ingen Nisslsubstans.

Lever: Der er tilsyneladende alt for få kerner, og man får det indtryk, at kun særligt kromatinrige kerner sværtes.

Nyre: Vævet noget udflydende. Der findes enkelte kerner, som er stærkt sværtede, men ellers er de fleste næsten ufarvede. Mitochondrier ret veludtalte, enkelte steder dannende hele bræmmer.

Svovlsyrling:

Lever: I forhold til K. er præparatet en del lysere, men de forskellige strukturer står skarpt tegnede, og der er ikke farveudfældninger af betydning. Der er større kontrast mellem mørke og lyse kerner end i K.

Hjerne: Præparatet står pænt med nydelig Nisslsubstans. Kerner og nukleoli er nydelige. Marvtråde er i forhold til K. noget blegere.

Nyre: Kommer meget nær på højde med K., men kan ikke måle sig med T. Kernerne i tubuli er pæne. Der findes børstesøm, og mitochondrier er lige så udtalte som i K. Der er så godt som ingen farveudfældninger.

Myresyre: Præparaterne er alle næsten lige så gode som T., omend let afblegede i forhold hertil. Der findes ingen farveudfældninger.

Lever: Kernerne (lyse og mørke former) er ret ensartede vævet igennem. Cellegrænser står skarpt.

Nyre: Udover nogen afblegning i forhold til T. (mere blå tone) ses ingen væsentlige forskelle, hvad angår kerner, børstesøm og mitochondrier.

Hjerne: Om kernefarvningen gælder det samme som nævnt under nyre- og levervævet. Der ser dog ikke ud til at være nogen finere Nisslsubstansfarvning.

Myresyre-alkohol: Præparaterne blegere end de præparater, der har været i den rene myresyre, men kernerne er som helhed pæne.

Lever: Kernerne står skarpere end i K., og er bedre differentierede i lyse og mørke former. Cellegrænser står pænt.

Nyre: Børstesømmen er næsten ikke farvet. Mitochondrier er de fleste steder kun antydningsvis til stede. Kerner er meget smukke.

Hjerne: Kerner, nukleoli samt marvtråde er pæne, men der kan ikke findes Nisslsubstans (der kan ikke påvises sikre ganglieceller i vævsstykkerne).

Myresyre-citrat: Ligeledes blegere og mere gråligt i tonen i forhold til de præparater, der har været i ren myresyre, men her som før er kernerne pæne. Der er flere farveudfældninger end i det foregående præparat, især i leveren.

Lever: Pæne kerner, skarpe cellegrænser.

Hjerne: Præparatet er lidt varierende differentieret, men der ses at være nydelig farvning af kerner, nukleoli og marvtråde. Nisslsubstansen er nogenlunde veludtalt.

Nyre: Det kniber med sværtningen af børstesømmen og mitochondrierne, især sammenlignet med K. Herved ses det tydeligt, at kernefarvningen er fortræffelig, medens der er en del at udsætte på den protoplasmatiske farvning.

Trikloreddikesyre: Præparaterne er en del blegere end K. og T.

Lever: Præparatet er næsten lige så kraftigt i farvetonen som K., men kernerne er ikke helt så klare. Cellegrænser skarpttegnede. Der er en del udfældninger.

Hjerne: Kerner og nukleoli samt marvtråde er helt pæne. Der ses ingen Nisslsubstans (ingen ganglieceller).

Nyre: Præparatet af samme udseende som i myresyre-alkohol og myresyre-citrat-præparaterne.

Trikloreddikesyre-formol:

1) Efterbehandlet med alkohol:

Nyre: Præparatet kommer næsten på højde med K., men ikke helt med T. Der findes en ganske pæn børstesøm, og der er nogenlunde pæne mitochondrier. Kernerne er lige så smukke som i T. og K.

Hjerne: Kerner, nukleoli og marvtråde findes lige så nydelige som i K. Der findes ingen ganglieceller, hvorfor man ikke kan udtale sig om Nisslsubstansens udseeende.

Lever: Præparatet er blegere blåt i tonen, men ellers noget pænere end K., idet der er bedre differens mellem kerner og protoplasma, samt mindre farveudfældninger.

2) Efterbehandlet med natriumsulfat:

Lever: Der ses helt god differens mellem lyse og mørke kerner. Farvetonen svarer til K., men der er lidt flere farveudfældninger. I forhold til T. er præparatet ikke ret godt.

Nyre: Præparatet er lidt blegere end K., men udviser næsten pænere kerner, idet der tydeligt ses forskel på kerner af forskelligt kromatinindhold. Der ses mange steder en særdeles pæn børstesøm, og der er som oftest smukke mitochondrier.

Hjerne: Der ses fremdeles ingen Nisslsubstans (ingen ganglieceller), men farvetonen svarer godt til såvel T. som K.

Saltsyre:

Lever: Cellegrænserne er ret skarpe. Kernerne viser ikke så god adskillelse mellem lyse og mørke former. Der er kun moderate farveudfældninger. Præparatets farvetone er kun lidt lysere end det tilsvarende K.

Hjerne: Vævet er meget blegere end K. Kerner og nukleoli er ret nydelige. Der er ingen Nisslsubstans.

Nyre: Vævet er meget blegt, kernerne er svagt farvede. Derimod er børstesøm og mitochondrier nogenlunde pæne, og mærkeligt nok pænere end for eksempel i trikloreddikesyrepræparatet. Præparatet er lidt dårligere end det tilsvarende salpetersyrepræparat.

Saltsyre-natriumklorid: Der er ingen sikre forskelle i forhold til de foregående præparater, udover at cellegrænserne i leveren er noget kraftigere tegnede, og udover at der kan anes lidt Nisslsubstans.

Mælkesyre:

Lever: Der findes i præparatet en del udfældninger, men mindre end for citronsyrepræparatets vedkommende. Vævet har et noget overfarvet præg, der dog ikke vanskeliggør skelnen mellem lyse og mørke kerneformer i levercellebjælkerne.

Nyre: Præparatet kan måle sig med T. i alle henseender, og så at sige det samme gælder for *Citronsyren*. Farvetonen er dog blegere sortagtig efter udsættelse for citronsyre, mere blålig efter påvirkning med mælkesyre og af samme tone som T.

Hjerne: Kerner, nukleoli og marvtråde pæne. Nisslsubstans? (ingen ganglieceller).

Farvninger med Carazzis hæmatoxylin.

(Snittykkelse fremdeles 6½ mikron. Farvning i ½ time. Ingen differentiering. Efterfarvning med tynd eosinopløsning i ½ minut).

Floroglucin-salpetersyre: Alle præparaterne er meget afblegede, som om kun eosinen har farvet. Ingen præparater viser kernetegning, medens der findes en bemærkelsesværdigt kraftig cellemembrantegning.

Kromsyre: Disse præparater er ligeledes meget afblegede, men i forhold til de forrige lidt mere blå i tonen. Der findes ingen kernekromatintegning, moderat cellemembrantegning. Hjernevævet viser overhovedet ingen struktur.

Triklorformol: Efterbehandling med natriumsulfat eller skylning i rindende vand gør øjensynligt ingen forskel, da præparaterne er lige dårlige og afblegede. Nyrepræparatet er det bedste med nogenlunde kromatintegning, men uden sikker forskel på kernerne i tubuli af 1. og 2. orden. Levervævet viser svag kromatintegning, men tydelige cellemembraner. Hjernevævet er faldet af objektglasset under farvningen.

Salpetersyre-alkohol: Svarer ganske til foregående.

Saltsyre-natriumklorid: Præparaterne noget stærkere farvede end de foregående præparater, men er ret rødlige i farvetonen (syreprægede). Kromatintegningen viser sig at være en del bedre end i de tidligere beskrevne præparater, omend man kun netop kan skelne mellem kerner af forskelligt kromatinindhold i lever og nyre. Præparaterne må fremdeles betegnes som dårlige.

Svovlsyre: Præparaterne svarer nærmest til salpetersyre-alkohol-præparaterne.

Salpetersyreformol: Præparaterne svarer nogenlunde til saltsyre-natriumklorid-præparaterne.

Kontrolpræparater: Er meget blege af farve med utydelig kernetegning. Præparatet er utilfredsstillende.

Trikloreddikesyre: Præparaterne er noget blegere i farven end for den følgende syres vedkommende, især gældende for nyrevævet. Ellers findes der pæn kromatintegning i både lever- og nyrevæv — meget bedre end i væv fra de foregående grupper.

Svovlsyrling: Væv rødlige i farvetonen, men ellers med pæn kromatintegning, der er bedre end for den foregående syres vedkommende.

Myresyre-alkohol: Leverpræparatet afviger ikke meget fra kontrolpræparatet, medens nyrepræparatet er meget bedre i kromatintegningen.

Salpetersyre og saltsyre: Præparaterne er forholdsvis ensartede. I henseende til kromatintegning og farvetone er de næsten så gode som trikloreddikesyre-præparaterne. Den rene salpetersyre giver pænere præparater end salpetersyreblandingerne (med undtagelse af salpetersyre-citrat).

Salpetersyre-citrat: Nyrevævet er lidt bedre end i svovlsyrlingpræparatet, medens levervævet er lidt dårligere end denne syres præparat. Såvel kromatintegningen, som celletegningen er bedre end i præparaterne, der har været i ren salpetersyre eller salpetersyre-blandinger.

Myresyre-citrat: Præparaterne er på højde med præparaterne i den foregående gruppe, idet kromatintegningen og farvetonen af vævene som helhed er identiske.

Myresyre: Præparaterne er en anelse bedre end foregående, måske lidt mere rødlige i tonen af lever- og nyrevæv.

Mælkesyre- og citronsyre: Præparaterne er ret ensartede, dog er mælkesyre-nyre og citronsyre-lever hver for sig bedst. Der findes i begge præparater de nydeligste kromatintegninger. Der kan ikke påvises nogen kvældning af vævene.

Fixation med Susa-farvning af lever og nyre med Carazzis hæmatoxylin

(Sammenlignet med kaformacetfixerede præparater, model IV)
(K. = Kaformacetpræparater, S. = Susapræparater).

Svovlsyre: Nyrevævet viser meget slet kernetegning i såvel bark som marv. Nøjagtigt det samme gælder for nyrevævet. Gælder også K.

Kromsalpetersyre: Især i levervævet er kernetegningen slet, og ikke afvigende fra forholdene ved svovlsyren. Nyrevævet måske en anelse bedre, uden at præparatet er brugbart. K. mgl.

Saltsyre: Nyrevævet er meget slet farvet, uden kernetegning i barken, mens der dog findes nogen kernetegning i marven. I leverpræparatet findes moderat kernetegning, men ikke meget bedre end for den foregående syres tilsvarende præparat. K. (lever og nyre) er langt bedre og finere i kernetegningen.

Salpetersyre-formol: Nyrepræparatet er ligesom det foregående meget slet, men udviser dog nogen kromatintegning. Levervævet er antageligt, omend hele billedet står blegt og sløret. K. (lever og nyre) viser ingen sikre forskelle fra de susafixerede vævsstykker.

Svovlsyrling: Nyrepræparatet er ikke godt, mens leverpræparatet er en anelse bedre end de foregående syrers præparater i henseende til kromatintegning. K. (lever og nyrer) svarer i udseende til de susafixerede præparater, udover at protoplasmaet i sidstnævnte er lidt mørkere.

Salpetersyre: Kromatintegningen er noget bedre end i de foregående præparater, og man kan i leveren begynde at se forskel på kerner med forskelligt kromatinindhold. Tegningen i nyren er fremdeles noget svag. K. (lever og nyre) viser ganske tilsvarende forhold.

Kontrolpræparater og *salpetersyrecitrat-præparater:* Er praktisk talt ens med nydelig kromatintegning i lever og nyre (sidstnævnte både i bark og marv). K. (lever og nyre) viser ingen større forskelle, udover at der er lidt mere rødlig farvetone end i S.

Trikloreddikesyre: Præparaterne er ikke så pæne som de to foregående i farvetone eller kromatintegning, men er på den anden side bedre end præparaterne, der har været i salpetersyre. K. (lever og nyrer) er blegere end S.

Myresyre: Leverpræparatet er uden større kontrast. Nyrepræparatet er nogenlunde, fuldt på højde med kontrolpræparatet. K. er mere rødlige i tonen, men også kraftigere i tegningen.

Citronsyre og mælkesyre: Lever- og nyrepræparatet kommer på højde med kontrolpræparaterne i henseende til farvetone og kromatintegning. K. er meget bedre, med en betydeligt mere distinkt kromatintegning.

Undersøgelser over Nissl-farvninger a. m. Carazzi.

(Model IV)

(Rygmarv fra dyr, der er susa- og kaformacetfixerede)

S.: Susapræparater

K.: Kaformacetpræparater

Svovlsyre: K. viser ret kraftig rødlig farvning af gangliecellernes protoplasma, men der er ikke tegn til Nissl-substans. S. viser vævet uden større tegning, lidt blegere i tonen end K, og næsten uden Nissl-tegning.

Kromsalpetersyre: K. viser nogen kernetegning i gangliecellerne, og en smule Nissl-tegning. S. viser væsentlig pænere Nissl-tegning, men til gengæld ser det ud, som om kernerne er faldet ud af samtlige ganglieceller. Farvetonen i de to præparater er praktisk talt den samme.

Saltsyre: Foregående præparater næsten bedre end disse. K. er det blegeste, uden Nissl-tegning. S. er mere rødligt i tonen; der er svagt antydet Nissl-tegning, men ingen kontrast i billedet.

Salpetersyre-formol: Gangliecellerne næsten ufarvede. I S. er det næsten som kerner og til dels også celler er faldet ud af præparaterne, i K. kan man netop skelne cellekonturerne, men der er ingen Nissl-tegning. Gliacellekernerne er nogenlunde farvede.

Svovlsyrling: S. viser den kraftigste gliakernetegning. Ligeledes er protoplasmaet ret kraftigt farvet, men der er næsten ingen differentiation mulig mellem protoplasma og Nissl-substans. K. er meget blegere i tonen, men til gengæld står de svagt udtalte Nissl-granula ret skarpt. I dette præparat giver S. altså mere tegning, K. mere kontrast.

Salpetersyre: Som ved det foregående præparat gælder, at S er stærkere i farvningen, medens K. er bedre i tegningen (kontrasten). Ingen af dem er særligt gode.

Trikloreddikesyre: Her kommer præparaterne op på højde med hinanden, dog er K. måske lidt stærkere i tonen. Gliaceller og ganglieceller er praktisk talt identiske.

Salpetersyre-citrat: S. næsten som foregående S., dog lidt kraftigere i tonen. Nissl-substans viser næsten samme forhold. I K. er cellebillederne noget fastere og tilsvarende klarere.

Kontrolpræparater: Ingen af præparaterne er virkeligt gode. K. er blegere med lidt bedre tegning. S. er mere rødlige, og især er der en ret diffus farvning af gangliecellernes kerner og protoplasma uden større differentieren i Nissl-granula.

Mælke-, myre-, citronsyre: Giver i den nævnte rækkefølge pæne præparater i K.-fixationen, medens der for dem alle gælder at gangliecellerne er kraftigt diffust farvede, uden tydelig uddifferentieren af Nissl-substans.

Haidenhain-Regaud farvning efter Susafixation (lever og nyrer).

(Model IV)

Svovlsyre: Nyrevævet ses nogenlunde ensartet differentieret med en mørkere bark og en lysere marv. Der er god differens mellem kernerne i tub. I og II, der er mitochondrier, men cellerne er apicalt flossede uden børstesøm. Ductuli

efferentes viser meget svagt farvede kerner, protoplasmaet er praktisk talt ufarvet og cellegrænser ret skarpe.

Levervævet er ensartet differentieret med mørkere og lysere partier. Som helhed er de lysere kerner næsten ufarvede, de mørkere nogenlunde farvede. Cellegrænserne er meget skarpe.

Kromsalpetersyre: Nyrevævet er ret ensartet differentieret. Det ses tydeligt, at der har fundet en ganske eensidig farvning af kernerne sted, medens protoplasmaet og hermed mitochondrierne er fuldstændig ufarvede. Der ses overhovedet ingen børstesøm. Der ses svage nuancer mellem kerner i tubuli I og II. (I ductuli eff. er kernerne stadigt dominerende, men meget lidt sværtede).

Levervævet viser en nogenlunde ligelig differentieren. Ligesom ved det førnævnte præparat ses eensidig sværtning af kernerne, medens protoplasmaet er ufarvet. Cellegrænserne er næsten fuldstændigt udviskede. Der er ingen større forskel mellem lysere og mørkere kerner.

Saltsyre: Ligesom ved svovlsyren er der ensartet differentieren, og man ser som helhed mere mørktfarvet bark og lysere marv- og marvstrenge.

Kernefarvningen er i virkeligheden dårligere end i svovlsyrepræparatet. Den protoplasmatiske farvning er ret udflydende, ikke rigtigt angivende mitochondrierne. Nogenlunde forskel mellem tubuli I og II, men præparatet ses som helhed udflydende. I ductuli efferentes er hverken kerner eller protoplasma ordentligt farvet.

Levervævet viser enkelte steder for hård differentiering. Iøvrigt er kernerne pæne med udmærket skel mellem lyse og mørke kerneformer. Protoplasmaet er næsten ufarvet. Cellegrænser er veludtalte og skarpe.

Salpetersyreformol: Ensartet differentiering med ret kraftig farvning visende lysere marv og mørkere bark. Protoplasma gråligt farvet, kerner helt pæne, omend noget svage (marven). I barken ses protoplasmafarvningen udflydende, ligesom mitochondrierne ikke er skarpt tegnede. God differens mellem kerner i tubuli I og II. Der ses ingen børstesøm.

I leveren ses ensartet differentiering. Kernefarvninger er gode med god differens mellem mørkere og lysere kerneformer. Cellegrænserne er skarpe. Protoplasmaet er gråligt i tonen uden særlige bestanddele.

Salpetersyre: Nogenlunde ensartet differentiering med mørkere bark og lysere marv. Kernerne i ductuli efferentes nogenlunde antydede, væsentligt stærkere i karrene. Protoplasma ganske ufarvet.

I barken ses god differens mellem kernerne i tubuli af I og II orden. Cellegrænser er udviskede, der er ingen børstesøm. Mitochondrierne er sværtede, men bortset fra enkelte steder er billedet af disse udflydende.

Levervævet er smukt ensartet differentieret. Cellegrænser er ret skarpe, der er fortræffelig differens mellem mørke og lyse celleformer. Protoplasmaet er svagt gråligt sværtet. Iøvrigt er kernerne fortræffeligt farvede.

Svovlsyrling: Differentieringen noget uregelmæssig, således at fortrinsvis opdelingen i lobuli forstærkes ved en kraftigere farvning perilobulært. Kernerne er smukt farvede, der er god differens mellem lyse og mørke kerner. Cellegrænserne er særdeles skarpt tegnede. Protoplasmaet svagt gråligt sværtet. Nyrevævet viser nogenlunde ensartet differentiation, med overordentligt store tinktorielle forskelle

mellem marv- og barksubstans. Kernerne er ikke særligt stærkt farvede, men til gengæld meget distinkt. Cellegrænser er påfaldende udtalte flere steder. Nogle steder ses perinukleære lyse zoner. I barken ses flere steder pæne mitochondrier, ligesom der også ses en veludtalt børstesøm. Der er udmærket differens mellem kerner i tubuli I og II. Lumina er gennemgående pæne og regelmæssige.

Salpetersyre-citrat: Differentieringen er pæn, dog med en stærkere farvning omkring v. centralis. Cellegrænser ses overordentligt skarpe. Alle forekommende kerner er næsten lige mørke. Protoplasmaet er lidt mørkere end det har været tilfældet med de foregående præparater.

Nyrevævet viser den sædvanlige differens mellem bark og marv, idet dog begge vævsarter er forholdsvis lige stærkt farvede. I marven ses kernerne stærkt og smukt farvede, der er pæne cellegrænser, og som i foregående præparater er der de fleste steder tydelige perinukleære, lyse zoner.

Barken viser ganske pænt tegnede mitochondrier, der ses flere steder en veludtalt børstesøm og differensen mellem lyse og mørke kerneformer er god. Lumina ses nogenlunde regelmæssige og pæne.

Trikloreddikesyre: Levervævet viser pæn differentiering med stærkere farvning omkring v. centralis. Der er skarpe cellegrænser, og der er især i de lysere områder god differens mellem lyse og mørke kerner, hvorimod der næsten ingen forskel er i de stærkere farvede områder. Protoplasmaet er ret monotont, svagt gråligt farvet.

Nyrevævet minder stærkt om det foregående præparat. Der er stærk sondring mellem marv og bark. I marven ses flere steder overordentligt tydelige cellegrænser, og der er også flere helt mørke kerner. Protoplasmaet er noget mørkere end i de foregående præparater, kernerne er pæne, flere steder med tydelig lys, perinukleær zone. I barken ses god differens mellem lyse og mørke kerner, og nogle steder synes der at være grænser mellem cellerne. Der er meget smukke mitochondrier, og der er særdeles mange steder en meget smuk børstesøm.

Kontrolpræparater: Levervævet er som helhed ret mørkt, men ensartet differentieret uden nogen udtalt paravenøs farveforstærkning. Kernerne ses overalt ret mørke, men dog med nogenlunde sikker adskillelse mellem lysere og mørkere kerneformer. Cellegrænser er skarpe, protoplasma ret mørkt gråligt uden sikre inklusioner.

Nyrevævet viser ensartet differentiering med ret udtalt forskel mellem bark og marv. Marven viser pæne kerner (nogle lyse, andre næsten kulsorte), protoplasmaet er næsten ufarvet. Cellegrænser ses meget skarpe med ret veludtalte, lyse, perinukleære zoner. Tubuli contorti viser smuk børstesøm og luminale mitochondrier, og der er tydelig forskel på kernerne i tubuli (dog ikke som tidligere omtalt forskel på kerner i tubuli I og II, men forskel indenfor samme tværsnit). Cellegrænser er de fleste steder helt pæne.

Et samtidigt farvet kontrolnyrepræparat (fix. med Kaformacet) viser ensartet differentiering, men det er iøjnefaldende, at kernerne er særligt tydelige i præparatet, med tydelige forskelle på de enkelte former. Protoplasmaet i marven er gulligt i tonen. I barken er det jævnt, svagt gråligt. Mitochondrier og børstesøm er næsten ikke til at se. Til gengæld er der flere steder meget smukke cellegrænser og vævet ser bedre bevaret ud.

Myresyre: Levervævet viser en ret ensartet differentiation, dog med udtalt farveforstærkning omkring vv. centrales. Cellegrænserne er meget skarpe, flere steder næsten for sorte, vistnok på grund af aflejring af farvestoffet intercellulært. Protoplasmaet er af lysere sortagtig tone, kernerne næsten monotont, ensartet mørke.

Nyrevævet viser ikke så udtalt forskel mellem tonen af bark og marv, som i tidligere præparater. Marvens protoplasma har en smuk, ensartet, grålig tone, kernerne er ret ensartede, af passende farveintensitet. Cellegrænser middel udtalte med tydelig perinukleær zone flere steder.

I barken ses antydning af cellegrænser i samlerørene. Der er nogenlunde differens mellem lyse og mørke kerneformer, selv om samtlige kerner som helhed er ret mørke. Mitochondrierne er veludtalte, gennemgående luminalt stillede og der ses overordentligt smukke børstesømme i tubuli contorti.

Mælkesyre: Leveren er ensartet, men øjensynligt ret hårdt differentieret. Alligevel er kernerne stærkt farvede, således at der næsten ikke ses forskel mellem lysere og mørkere kerneformer. Cellegrænserne er meget skarpe. Protoplasmaet er mellemgråt.

Nyren viser ensartet differentiation. Forholdet mellem bark og marv er omtrent som ved myresyren, dog er protoplasmaet i barken noget mørkere end for de myresyrebehandlede præparaters vedkommende. I marven er kernerne meget skarpt tegnede med tydelige perinukleære zoner. Protoplasmaet er mellemgråt. Cellegrænserne er ret tydelige, lumina er regelmæssige.

I barken ses nogenlunde forskel på lyse og mørke kerneformer, selv om samtlige kerner er ret mørke. Der ses antydede cellegrænser i samlerørene og mitochondrierne er stærkt sværtede, gennemgående fordelt over hele cellen. Der er overordentligt smukke børstesømme i tubuli contorti.

(Det er vanskeligt at udtale sig om skrumpning af cellerne. Variation af lumina behøver ikke at give noget fingerpeg, idet en sådan kan være udtryk for varierende funktionsgrad).

Citronsyre: Levervævet viser nogenlunde ensartet differentiation med antydet forstærket farvning omkring vv. centrales. Protoplasmaet er mellemgråt. Kernerne er meget mørke, næsten uden forskel mellem lyse og mørke kerneformer. Der er særdeles skarpe cellegrænser.

Nyren viser pæn ensartet differentiation med den sædvanlige forskel mellem bark og marv.

Barken viser meget smukke cytologiske billeder, især er samlerør og tubuli contorti meget smukke og regelmæssige. Der er pæne cellegrænser i samlerørene, og der er overordentligt smukke luminalt stillede mitochondrier i tubuli contorti. Her er der ligeledes meget smukke børstesømme. Selv om kernerne er ret sorte, er der tydelig forskel på kernerne i tubuli contorti og i samlerørene.

Marven viser mellemgråt protoplasma, stærkt tegnede kerner med perinukleære lyse zoner, ret veludtalte grænser mellem de enkelte celler.

Farvninger a. m. Haidenhain-Regaud (lever-nyre-rygmarv).

(Model V)

Svovlsyre: Levervævet viser en dårlig kernefarvning, der ikke er meget stærkere

end protoplasmafarvningen. Til gengæld er protoplasmaet stærkere farvet end det ved tidligere anvendte fixations- og farvemetoder. Desuden synes det fastere og bedre fixeret med ensartet farvning og meget skarpe cellegrænser. Differentieringen er ret uensartet. Der ses ingen forskel på kernefarvbarheden.

Nyrevævet viser ret ensartet differentiering men med kraftigere farvning af barken og meget svagere farvning af marven, marvstrengene og glomeruli. Især er kerner i sidstnævnte enkelte steder overhovedet ikke farvede. I barken ses i tubuli massiv sværtning af chondriomet, så kernerne næsten ikke kan ses, og mitochondrier ikke kan uddifferentieres. I de øvrige tubuli ses en meget smuk kernefarvning, som også ses i marvens kerner. Der er påfaldende velbevarede cellegrænser luminalt, og der er veludtalte supranukleære zoner.

Protoplasmaet er i marven ufarvet, uden indhold. Cellegrænser er meget tydelige. Ingen perinukleære lyse zoner. (På grund af protoplasmaets ufarvethed).

Rygmarven er meget bleg. Alligevel er der celle- og kernetegninger. Således ses der udviskede gliacellekerner, der er tydelige multipolare ganglieceller med Nisslgranula (kromatoid) og en bleg kerne med en stærkt farvet nukleolus.

Saltsyre: Differentieringen af levervævet er ret ensartet, enkelte steder med tendens til mørkere partier omkring vv. centrales. Cellegrænserne er som helhed ret skarpe, protoplasmaet er næsten ufarvet, men ikke des mindre har man tydeligt indtrykket af, at der findes en meget betydelig fasthed af vævet. Kernerne er overalt meget skarpt konturerede med ringe forskel på lyse og mørke former, idet samtlige kerner er ret stærkt sværtede. Der ses hist og her inklusioner i protoplasmaet.

I nyrevævet ses som helhed ensartet differentiering. Der ses fremdeles en meget udtalt og confluerende sværtning af basallegemerne i tubuli contorti, fuldstændig maskerende kerner i disse. Der ses ingen børstesøm. Den luminale begrænsning af cellerne er meget skarp de fleste steder, tydende på en meget kraftigt virkende fixation. De glomerulære kerner er væsentligt bedre tegnede end i forrige præparat. Tydelige supranukleære zoner.

I marven ses meget smukke kernetegninger, både i de mindre slynger (Henles) og samlerørene. Protoplasmaet i samlerørene er næsten ikke farvet, og dog ses hist og her tilløb til perinukleære zoner. Cellegrænser kan ses, men er ikke særligt tydelige.

Rygmarven er som helhed bleg i tonen, men med en betydeligt bedre strukturtegning end i foregående præparat. Der ses tydelige gliacellekerner, der ses meget smukke og velafgrænsede multipolare ganglieceller, indeholdende et veludtalt tigroid, en forholdsvis bleg nukleus og en meget mørk nukleolus samt kromatinkorn. Der ses en meget smuk marvskedefarvning.

Salpetersyre: Levervævet viser uensartet differentiering, og dog er vævet sammenlignet med førnævnte præparater i enkelte afsnit meget smukkere farvet. Kernerne er ret skarpt tegnede uden indbyrdes forskel af betydning. På den anden side danner de ringe kontrast til det stærkt farvede protoplasma. Cellegrænserne er ret stærkt udtalte. Galdegangene viser overordentligt smukke billeder med nydelige kerner og ufarvet protoplasma med inklusioner. Saltsyren viste samme forhold, men ingen inklusioner. Svovlsyren viste slette kernebilleder uden inklusioner.

Nyrevævet viser tydeligt intens sværtning af tubuli contorti, medens farvningen

af de øvrige rør både i bark og marv samt farvningen af cellerne i glomeruli er ret uniform. Differentieringen er efter dette meget ensartet uden større skel i farvemæssig henseende mellem bark og marv. Protoplasmaet i marven er svagt gulligt (jernalunfarven), kernerne er distinkte og tydelige, og der er ret skarpe cellegrænser. I barken ses meget tydelige supranukleære zoner, men der ses ingen kerner og ingen børstesøm.

Rygmarven viser smukke ependymceller. Der er meget tydelige gliacellekerner, medens de multipolare ganglieceller er noget mindre kontrasterende til det omgivende gliavæv. I ganglicellerne ses en meget skarp kernemembran, og nukleolus er kulsort.

Svovlsyrling: Levervævet er forholdsvis ensartet differentieret fremdeles med tendens til paravenøs farvningsforstærkning. Der findes her meget smukke og veludtalte levercellebjælker som tegn på en ualmindelig smuk fixation. Protoplasmaet er ret stærkt farvet (mørkt blåligt) og kernerne er meget distinkte uden større forskel på lyse og mørkere former. Der er meget udtalte cellegrænser. I galdegangene ses yderst smukt epithel indeholdende basaltstillede kerner med vexlende indhold af kromatin. Endvidere ses smukke apicale inklusioner.

Nyrevævet viser en meget ensartet differentiering, dog således, at tubuli contorti er meget iøjnefaldende på grund af særdeles udtalt sværtning af basallegemerne. Marven er meget blegere end barken. Blegheden er mest udtalt i malpigiske legemer, marvstrålerne og i selve marven. I marven ses nogen forskel på kernefarvningen. Protoplasmaet er svagt gulligt (jernalunfarven). Luminale celle- og kernegrænser er meget distinkte. I barken ses meget tydelige supranukleære zoner. Hist og her skimtes kerner, men der ses ingen børstesøm.

Rygmarven står noget bleg (stærk differentieret?). Trods dette er ganglicellerne overordentligt smukke, nervetråde pænt farvede og der er meget tydelig Nissl-substans. Kernepletten er meget sort, men selve karyoplasmaet afviger ikke stort fra protoplasmaet. Gliacellekernerne er fine. Gliavævet er gulgråt af farve.

Salpetersyrecitrat: Differentieringen er uensartet. Levervævet er ret mørkt, kernerne næsten kulsorte. Kernegrænserne er meget distinkte, cellegrænserne noget varierende, men som helhed distinkte. Galdegangene er opbyggede af meget smukke celler med basalt stillede, aflange kerner og apicale inklusioner.

Nyrevævet viser næsten forhold som foregående nyrepræparat, dog er kernerne noget kraftigere tegnede, og marven som helhed lidt mørkere.

Rygmarven fremtræder mørk, idet gliavævet er ret stærkt medfarvet. Der er derfor ingen større kontrast mellem gliacellekerner og multipolare ganglieceller, hvor der i sidstnævnte heller ikke særligt tydeligt er uddifferentieret Nissl-substans. Kernemembranen er utydelig, medens selve kernepletten er meget skarp.

Et lille, extra stykke levervæv viser meget smuk galdegang, hvori der apicalt findes de nydeligste inklusioner.

Trikloreddikesyre: Differentieringen i levervævet god med udtalt øget farvning omkring vv. centrales. Cellegrænser er flere steder særdeles skarpe og kerner er meget distinkte. Protoplasmaet ses ret mørkt. Et enkelt sted findes en meget lille galdegang med de tidligere nævnte inklusioner.

Nyrevævet viser udtalt kontrast mellem den lysere marv og den meget mørke

bark. Kernerne i marven er meget distinkte. Protoplasmaet ses gulgråt. Cellegrænser i samlerør pæne.

I barken ses flere steder tegn til børstesøm, nærmest som en lidt mørk bræmme uden på den supranukleære lyse zone, men den brede børstesøm, som i susafixeret præparat findes ikke.

Rygmarven viser nogenlunde kontrast mellem kerner i gliaceller og ganglieceller og gliavævets farvning. Der er flere steder ret tydelig Nissl-substans, kernemembranen er nogenlunde veludtalt og kernepletten er fin. Marvskederne er helt pæne.

Kontrolpræparater: Levervævet er nogenlunde ensartet differentieret, omend ikke lige godt alle steder. Levercellebjælkerne er de fleste steder overordentligt skarpt tegnede og kernerne er meget mørke uden større forskelle. Cellegrænserne er meget distinkte. Galdevejene viser beklædning med smukt epithel, hvis protoplasma er næsten ufarvet og hvis kerner står meget skarpt. I protoplasmaet ses især i de mindste gange talrige inklusioner.

Nyrepræparatet svarer til foregående nyrepræparat, idet der hist og her ses børstesøm. Kernerne er meget mørke og distinkte, også i marven, hvor protoplasmaet er ret mørkt. Der er især i samlerørene i marven kraftigt udtalte cellegrænser. Enkelte steder perinukleære lyse zoner.

Rygmarven syner overfarvet. Der er tydelige gliacellekerner, tydelige multipolare ganglieceller med ret distinkt kernemembran og tydelig kerneplet. Nissl-substansen ses som meget mørke brokker. Selve karyoplasmaet er forholdsvis lyst.

Myresyre: Levervæv er ensartet differentieret. Cellegrænser er meget skarpe, kerner er særdeles distinkt tegnede og levercellebjælkerne er smukt sammenhængende. Galdegangene er som i de tidligere præparater.

Nyrevævet syner, som var det udelukkende kernefarvet. Der er således næsten ingen børstesøm at se. Kerner er meget mørke og distinkte. Cellegrænser i marven er ret skarpe.

Rygmarven er noget afbleget, og dog står kernekonturer meget tydeligt. Der er en del smukke ganglieceller med Nissl-substans, lys kerne og mørk kerneplet.

Mælkesyre: Leveren er meget mørk, men ellers af udseende som i foregående grupper. I en lille galdegang ses meget nydelige inklusioner.

Nyren ses også som foregående med pæn børstesøm.

Rygmarven af udseende som myresyrebehandlet rygmarv.

Citronsyre: Som de sidste par præparater.

Farvninger med Carazzis hæmatoxylin-cosin.

(Model V)

Svovlsyre: Samtlige præparater viser allerede makroskopisk en afblegning i forhold til de øvrige præparater. Mikroskopisk er vævene opblødte, praktisk talt uden kromatintegning. Dette gælder især rygmarven, hvor der ikke er Nissl-granula eller kerneplet, ejheller kromatintegning i spinalkanalcellerne. Med undtagelse af kernerne i tub. contorti I, hvor der er antydningsvis kernetegning, ses kernerne som vakuoler i de ret velafgrænsede celler.

Saltsyre: Til forskel fra foregående er disse præparater makroskopisk langt stærkere farvede, og mikroskopisk er der overordentlig stor forskel, især i kromatintegningen.

I levervævet, som er ensartet farvet, ses et protoplasma af svagt rødlig farve med få vakuoler. Kernernes kromatin præsenterer sig distinkt med ringe forskel på lysere og mørkere former. Kromatinet i galdegange- og kapillærer er ligeledes smukt. Der er næsten ingen cellegrænser at se. I nyrevævet, der er pænt ensartet farvet, er protoplasmaet af samme tone som levervævet. Kernerne er pænt tegnede, omend ikke helt så skarpt som i levervævet. Det er til at se forskel på lysere og mørkere kerneformer. Der er praktisk talt ingen cellegrænser. Der kan ingen børstesøm ses og heller ingen mitochondrier. Farvningen af marven er noget svagere end barken.

I rygmarven er der helt pæn tegning i nukleolus og gliacellerne, men der er ingen sikker Nissl-substanstegning.

Salpetersyre: Makroskopisk af samme tone som de foregående. Mikroskopisk er den væsentligste forskel kernerne, som i foregående præparater forekommer mere udvandede, er mindre blå. Protoplasma i lever og nyre er svagt rødligt. Kerner er kraftigt tegnede, af ret ren blå tone. Der er så godt som ingen vakuoler, ingen cellegrænser at se og der er tydelig forskel på lysere og mørkere kerneformer. Vævet er ensartet farvet.

Nyrevævet viser ligesom levervævet en god differentiation (præparaterne er ikke differentierede). Der ses ingen børstesøm, ingen mitochondrier og der ses ingen cellegrænser. Der er forskel på lyse og mørke kerner, og der er den sædvanlige farveforskel mellem bark og marv. Ligesom i foregående nyrepræparat ses samlerørene i marven påfaldende stærkt kontrasterende med de øvrige strukturer, især hvad angår protoplasmafarvningen, men også i nogen grad kernefarvningen.

I rygmarven ses meget smuk kernetegning i gliaceller og centralkanalceller, ligesom der er smuk nukleolus i gangliecellerne. Der er fremdeles ingen Nissl-substanstegning.

Svovlsyrling, trikloreddikesyre og salpetersyre-natriumcitrat: Er såvel makroskopisk som mikroskopisk nogenlunde ens, idet kernefarvningen og protoplasmafarvningen er ensartet, middelstærk blå. I levervæv og nyrevæv er der ingen cellegrænser. Der er i leveren moderat med vakuoler. Der findes i nyren en svagt skinnende børstesøm og vævsfarvningen er ensartet. Der findes ingen Nissl-granula.

Myre-, mælke- og citronsyre viser i det store hele ligeledes ensartede forhold med hensyn til kerne- og protoplasmafarvningen, dog er citronsyre-nyre noget mere distinkt i kernetegningen (kromatintætheden) end de andre, medens til gengæld citronsyre-lever er svagere tegnet (præparatet har dog været udsat for et teknisk uheld, idet det under monteringen tørrede. Dette har vist sig ved, at flere af kernerne har fået et ejendommeligt lyst udseende). Der findes som i foregående række en let skinnende børstesøm, ikke meget pænere end i disse. Der er ingen tydelige cellegrænser. Der ses ingen Nissl-substans i rygmarvens multipolare ganglieceller.

MODELFORSØG II–V

(intravital fixation)

Farvninger med Einarsons gallocyanin

(Model II - III)

Salpetersyre: Præparaterne er praktisk talt af fuldstændig samme udseende som kontrolpræparaterne. Levervævet er lidt svagere farvet end i K. (= Kontrolpræparaterne). Nyrepræparaterne viser lidt stærkere farvetoner i K., medens hjernesnittene er ens. Kromatintegningen i kernerne er ganske god. I K. er der smuk Nissl-substansfarvning, men der er desværre ingen ganglieceller i det salpetersyrebehandlede hjernesnit.

Floroglucin-salpetersyre: Makroskopisk minder præparaterne om mislykkede Fontana-præparater, og det samme gælder det mikroskopiske billede. Alle strukturer har et gulligt skær, men er ellers ufarvede. Det er bemærkelsesværdigt, at omkredsen af nyrens tubuli samt cellemembranerne i hjerne og lever står meget skarpt, næsten tegnet med sort. Der er ingen kromatintegning, og ikke antydning af Nissl-substans.

Kromsalpetersyre: Tonen er meget svag blålig i alle præparaterne, og kromatintegningen er tilsvarende ringe i forhold til K. Strukturerne er helt godt bevarede, men der er ingen Nissl-substans.

Salpetersyre-citrat: Er langt den bedste i salpetersyre-gruppen. Nyrepræparatet er måske ikke meget stærkere farvet end K., men både hjerne- og leversnit er meget mere blå af farve end K. Farvetonen er smuk mellemblå. Kromatintegningen er fortræffelig, hvorimod Nissltegningen ikke kommer på højde med K., idet man kun ser konturer af Nissl-substansen.

Salpetersyre-formalin: Væv svagere i tonen end ved den rene salpetersyre, gældende for alle tre omhandlede vævsarter. Nissl-substansen er kun svagt konturet. I det hele taget er hjernepræparatet det dårligste.

Salpetersyre-alkohol: Efter påvirkning af denne syreblanding virker præparaterne ufarvede. Altså er præparaterne endnu slettere end kromsalpetersyrepræparaterne.

Saltsyre: Vævene er mere afblegede end K. I forhold til salpetersyrepræparatet er nyrepræparatet meget dårligt, medens leverpræparaterne er nogenlunde ensartede. Hjernevævene er bedst for salpetersyrens vedkommende, især er kromatintegningen langt finere og klarere. Der findes ikke Nissl-substans i nogen af præparaterne.

Saltsyre-natriumklorid: Præparaterne er endnu mere afblegede og rødlige i farvetonen end foregående. Kromatintegningen er yderst slet. Der ses ingen Nissl-substans.

Svovlsyre: Præparaterne er fuldstændigt ufarvede.

Kromsyre: Præparaterne er pænere end saltsyrepræparaterne, men kommer ikke på højde med salpetersyrepræparaterne. Der kan ikke påvises Nissl-substans.

Svovlsyrling: Præparaterne er langt mere blå i tonen end K. gældende for alle vævsarter. Der er ingen Nissl-substans i hjernevævet, og der synes ejendommeligt nok at være fuldstændigt klare partier svarende til gangliecellernes protoplasma. Nukleoli er ganske pæne, omend noget blege. Kernetegningen er nydelig, især i

leverens galdegange, og man ser tydeligt forskel på mørkere og lysere kerneformer i levercellebjælkerne.

Triklorformol: (Efterbehandlet med alkohol eller natriumsulfat): Begge hold præparater er dårligt farvede.

Trikloreddikesyre: Præparaterne er ikke særligt gode, men svarer dog nærmest til K. Der findes Nissl-substans hist og her.

Myresyre: Leverpræparatet er meget smukt med klar og skarp kernetegning. Præparatet kan måle sig med myresyre-citratpræparatet, og står i kvalitet langt over myresyre-alkohol-præparatet (i det hele taget er de alkoholiske syreblandinger uheldige i henseende til farveresultater). Nyrevævet er meget smukt med stærkt farvede og klare kerner. Enkelte steder ses i nyrevævet metakromasi(?). Hjernevævet er også smukt og indeholder veludtalt og smuk Nissl-substans.

Myresyre-citrat og -alkohol: Se ovenfor. I Hjernepræparatet fra begge hold ses smuk Nissl-substans. Kerne- og kromatintegningen er god, men kan ikke måle sig med forholdene i præparatet, der har været i ren myresyre.

Mælkesyre og citronsyre: Er langt de bedste præparater i denne farverække. Der findes især i mælkesyrepræparaterne en overordentlig smuk kromatintegning.

Farvninger med Einarsons gallocyanin

(Model IV)

(Rygmarv fra dyr fixerede med Susa eller Kaformacet)

(K. = kaformacetpræparater. S. = susapræparater)

Svovlsyre: S. viser overhovedet ingen tegning. K. viser svagt antydede gliacellekerner. Gangliecellerne kan lige skimtes, men der er ikke antydning af Nissl-granula.

Saltsyre: Begge præparater er lige slette. Der er kun antydede kerner i gliacellerne, og der er kun antydning af farvning af ependymcellerne. Man kan ikke se ganglieceller (eller Nissl-granula).

Formol-salpetersyre: Farvningen af ependymcellerne er lidt bedre, medens gliacellerne er som i foregående præparat. Der findes ingen ganglieceller. Tegningen er bedst i K.

Krom-salpetersyre: Tegningen er fremdeles bedst i K. både af ependym- og gliacellekerner. Der er Nissl-substansfarvning i begge præparater, bedst i K. I S. ses et ejendommeligt, tilsyneladende bortfald af kernerne i gangliecellerne.

Salpetersyre: S. er bedst, især i henseende til farvning af kernerne i gliacellerne og i spinalkanalens ependymceller. Der findes overhovedet ikke farvning af Nissl-granula, medens der er ganske pæn farvning af nukleolerne i gangliecellekernerne.

Svovlsyrling: Præparaterne er ikke særligt skarpe eller kraftige i tegningen, men der er dog i K. nydelige Nisslgranula. I S. ses ringe specificitet, idet såvel protoplasma som Nisslgranula er ret mørkt farvede uden tydelige differentieringsmuligheder. Ependymcellerne er helt pæne i begge præparater, nydeligst i K.

Salpetersyre-citrat: Ependymceller og gliacellekerner er praktisk talt identiske. For gangliecellernes vedkommende synes S. at være noget kraftigere i Nissl-tegningen, omend noget udflydende. Nukleolusfarvningen er den samme.

Trikloreddikesyre: Gliacellekerner og ependymcellekerner er næsten identiske,

bedst i K. Gangliecellekernerne er også ensartede. Nissl-substanstegning er svag i K., stærkere i S. Til gengæld er der stærkere medfarvning af protoplasmaet i sidstnævnte præparat.

Kontrolpræparater: K. og S. er nærmest identiske, udover at der er let medfarvning af protoplasmaet i S.

Myresyre: Begge præparater er overmåde pæne i gliacellekerner, gangliecelle- og ependymcellekerner. Nissl-substansen er skarpest i K. Den er også kraftigt farvet i S., men skæmmes her af en udtalt protoplasmatisk medfarvning.

Samme forhold gør sig gældende for mælkesyre og citronsyre, hvor Nissl-substansen dog er mere udflydende. Iøvrigt findes markant tegning af kernerne i gliacellerne og ependymcellerne.

Farvning med gallocyanin af lever- nyre.

(Model IV)

Svovlsyre: Både lever- og nyrepræparatet viser kun meget svage afskygninger af de pågældende væv, især er det næsten umuligt at identificere nyrevævet. I levervævet ses svage antydninger af kerner og cellegrænser.

Saltsyre: Nøjagtigt som foregående præparat. Også her er det lettere at se struktur i levervævet end i nyrevævet.

Salpetersyrekrom: Farvningen af nyrevæv lige så slet som i det foregående, idet man kun lige kan ane celle- og kernekonturer. Leveren indeholder begyndende kernetegning. Protoplasmaet er praktisk talt ufarvet. Ingen synlige cellegrænser.

Salpetersyreformalin: Lever og nyre er betydeligt bedre end foregående. Lever er fremdeles det bedste præparat. Begge vævsarter er ensartede farvede af svag gråblå tone. I nyren er kernerne i glomeruli tydelige, omend ikke ret stærkt farvede. Kernerne i de øvrige celleelementer er svagt udtalte, uden tydelig forskel i kromatinindholdet. Der er ingen forskel på marv og bark i tinktoriel henseende. Leveren viser så godt som ufarvet protoplasma, og der er svagt antydede cellegrænser. Kernerne er ret pæne med begyndende differens mellem lysere og mørkere kerneformer.

Salpetersyre: Lever næsten som foregående. Nyrevævet viser samme svage gråblå tone som foregående, uden forskel på bark og marv. Kerner praktisk talt som foregående. Synlig forskel på lysere og mørkere kerneformer.

Trikloreddikesyre: Svarer i eet og alt til salpetersyrens forhold. Der er antydet stærkere blålig tone af sidstnævnte. Kerner viser både i lever og nyre forhold som i foregående præparat.

Svovlsyrling: I leveren ses meget tydelige cellegrænser, protoplasmaet er ufarvet, og kernerne er skarpt tegnede med tydelig differens mellem lyse og mørke former. Nyrevævet er også bedre farvet end foregående. Levervævet er fremdeles det bedst farvede. En vis forskel gør sig gældende i bark og marv, idet kernerne sidstnævnte sted er noget kraftigere konturerede, måske i nogen grad fordi protoplasmaet er mindre farvet i marven end i barken. Der er tydelig forskel på mere lyse og mere mørke kerner.

Salpetersyrecitrat: Kernerne i lever- og nyrepræparatet ses af praktisk talt samme farvetoner- og intensitet. I leveren ses ufarvet protoplasma, smukke kerner

med tydelig forskel mellem mørke og lyse former. I nyren ses kernerne ret stærkt tegnede, omend de i marven forekommende er en del kraftigere farvede.

For de sidste organiske syrers vedkommende *(myresyre, citronsyre og mælkesyre)* er lever bedst efter myresyrepåvirkning, derefter kommer citronsyre og sidst mælkesyre. Hver for sig er det meget smukke præparater i tinktoriel henseende. Cellegrænser er skarpe, kerner står meget skarpt tegnede og der er meget tydelige forskelle på lyse og mørke kerner. Kontrolpræparatet er på højde med citronsyrepræparatet.

For nyrevævet er rækkefølgen: Myresyre, citronsyre og mælkesyre. I samtlige præparater ses skarp kernetegning og udtalt differens mellem lyse og mørke kerneformer. Susafixeret kontrol-nyrepræparat er på højde med myresyrepræparatet. Kaformacetfixeret kontrolnyre står på højde med mælkesyrepræparatet.

Farvninger med gallocyanin

(Lever, nyre og rygmarv)

(Model V)

Svovlsyre: Såvel lever, nyre som rygmarv er fuldstændigt uden kernefarvning. Allerhøjst er der ringe protoplasmatisk farvning.

Saltsyre: Leverpræparatet viser ringe kromatintegning, idet kernerne er nogenlunde tegnede, dog uden forskel på lyse og mørke kerneelementer. Der er så godt som ingen cellegrænser at se. Kernerne i galdegangene er pæne, men overgår ikke kernerne i levercellerne.

Nyrepræparatet viser samme forhold: Begyndende kernetegning, der er ret ens i bark og marv.

Rygmarven viser farvning af kernerne i gliacellerne af samme grad som cellerne i de ovenfor beskrevne organer. De multipolare ganglieceller kan man finde ved hjælp af kerneblære og kerneplet, men der ses ikke antydning af Nissl-substans.

Salpetersyre: Nyrepræparatet viser sig at være meget bedre i kernetegningen end foregående, med større forskel mellem lyse og mørke kerneformer, ligesom man kan begynde at skelne cellegrænser i marven.

Lever viser en ret distinkt kernetegning, og sammenlignet med saltsyrepræparatet med mere kromatintegning. Ved nedblænding ses fine cellegrænser. Kernerne i galdegangscellerne er overordentligt smukke.

Rygmarv viser ret god kernetegning i såvel gliaceller som i de multipolare ganglieceller, men der er ikke antydning af Nissl-substans.

Trikloreddikesyre: Levervævet viser ret tydelige cellegrænser. Vævet er ensartet af farve, og der er tydelig forskel på mørkere og lysere kerneformer. Kernerne er særdeles smukt tegnede.

Nyrevævet viser ligeledes smukt tegnede kerner, væsentligt kraftigere end for salpetersyre-præparatets vedkommende.

Rygmarv viser også ret stærk farvning af kernerne, men der kan ikke findes Nissl-substans.

Svovlsyrling: Kernetegningen i samtlige tre præparater er bedre end i de foregående præparater. I rygmarv findes et påfaldende misforhold mellem den gode kernefarvning og den manglende, eller meget svagt udtalte Nissl-substansfarvning.

Salpetersyre-citrat: Alle tre præparater er bedre end de foregående præparater. I nyrepræparaterne lægger man mærke til, at samlerørene er mørkere end i tidligere præparater, foruden at der ses en mørk, luminal bræmme.

Lever viser helt pæne cellegrænser, kerner står meget skarpt.

Rygmarven viser en særdeles smuk og intens farvning af kernerne i spinalkanalceller. Kernerne i gliacellerne er meget markante, således at der er et stigende misforhold mellem kernefarvning og Nissl-substans, som er ufarvet. De multipolare ganglieceller er udviskede i strukturerne, men man kan dog se såvel kerneplet som kerneblære.

I de følgende præparater *(Myre-, citron- og mælkesyre)* nævnt med den bedste først, ses der nok cellegrænser, men ikke med stigende tydelighed. De tre hold præparater indenfor hver syregruppe følges forbavsende pænt ad, og viser en tiltagende, ren mørkblå tone af kernerne. Kernerne er ualmindeligt smukt farvede og står meget skarpt, bedst i myresyrepræparatet. Dette forhold går igen i nyre- og leverpræparatet, og tildels også i rygmarvspræparatet, hvor der er smuk tegning af gliacellekerner samt kerner i spinalkanalens celler. Der er så godt som ingen farvning af Nissl-substansen.

Kontrolpræparaterne: er de bedste, men myresyrepræparaterne er meget nær på højde med dem. Der er ikke fundet påfaldende svulst eller skrumpning af de cellulære elementer efter påvirkning med de sidste tre organiske syrer.

Det er værd at lægge mærke til, at kontrolrygmarvspræparatet viser udtalt misforhold mellem kernefarvning og Nissl-substansfarvning, som beskrevet under organisk syre- præparaterne. Der ses antydning af korn, eller en mere blåsort, udflydende masse, som slører kernens grænser noget, men slet ikke kan identificeres som Nissl-substans.

B: KNOGLEPLADEMODELFORSØG

Farvning af formolfixeret kalverygmarv med gallocyanin

2 n. syrer ved stuetemperatur

Kromsyre: Viser meget svage, grå skygger svarende til de store multipolare ganglieceller, indeholdende en ganske svag kerneplet. Der er ingen synlig Nissl-substans, ingen farvning af gliacellekerner og meget svag farvning af ependymcellekernerne.

Trikloreddikesyre: Lidt stærkere farvning af ependymcellekerner, men iøvrigt lige så slet som kromsyrepræparatet. Desuden er præparatet skæmmet af en del udfældninger.

Salt- og salpetersyre: Bedre farvning af ependymcellekernerne, og begyndende tegning i gliacellernes kerner, men gangliecellerne er kun svagt gråligt, diffust farvede uden antydning af Nissl-substans. Hist og her meget svagt udtalte kernepletter.

Ovenstående syrer viser sammenlignet med tilsvarende 1 n. syrer ved stuetemperatur en udtalt mindskning af farveintensiteten.

Præparater, der har været udsat for de øvrige 2 n. syrer viser en intens farvning af samtlige elementer, en farvning, som for de tre organiske syrers vedkommende

(myresyre, eddikesyre og mælkesyre) mærkværdigvis er mere intens end ved de tilsvarende 1 n. syrer.

1 n. syrer ved stuetemperatur

Kromsyre: Slettest farvet. Man kan lige ane de multipolare ganglieceller som blågrå klatter. Der er dog en antydet kerneplet. Nissl-granula kan kun med vanskelighed skimtes. Ependymcellernes kromatin er meget svagt farvet og endda meget udflydende.

Salt- og salpetersyre: Ependymcellernes kerner er praktisk talt ensartede og af samme intensitet og kvalitet som i præparaterne fra de øvrige syrer. Gliacellekernerne er pænt tegnede, af samme karakter som i trikloreddikesyrepræparaterne. Kernepletten middelfarvet. Nissl-substansen er svagt farvet, men dog tydeligt synlig.

Trikloreddikesyre: Ependymcellernes kromatin som ovf. Gliacellekerner ses som ved saltsyre og salpetersyre. Kerneplet er middelfarvet og Nissl-substansen under middelfarvet, men dog bedre end i de to foregående præparater.

De øvrige syrer viser stort set ensartede forhold for kerneplet, gliacellekerner, ependymcellekerner og Nissl-substans. Alle elementerne står distinkt, i en ren, blå tone, uden tendens til udflyden.

Ved sammenligning mellem grupperne af 1 n. syrer ved forskellig temperatur findes gældende for samtlige præparater, at den højere temperatur er ødelæggende for såvel kernefarvning, som for Nissl-farvning. Den lavere temperatur viser en bevarende virkning overfor farvning af kerner og i særdeleshed af Nissl-substans, således at Nissl-substansen i saltsyre- og salpetersyrepræparaterne er ganske pæn. Den beskyttende effekt er ens for de forskellige syrearter, således at der intet er at vinde ved at anvende een bestemt syre ved afkøling.

Ved sammenligning med kontrolpræparatet findes som tidligere omtalt under de indledende modelundersøgelser, at kromsyre-, salpetersyre-, saltsyre- og trikloreddikesyrepræparaterne er dårligere end kontrolpræparatet. De øvrige syrepræparater viser en mere distinkt og stærkere farvet Nissl-substans, idet baggrunden i disse præparater er mindre farvet end det er tilfældet i kontrolpræparatet.

Hvad årsagen hertil er, ved jeg ikke, idet rygmarvspræparaterne er fixeret i formol, ikke i kaliumbikromatholdige vædsker.

1/10 n. syrer ved stuetemperatur

Saltsyre og salpetersyre: Middelstærk farvning af ependymcellekerner, kerneplet, Nissl-substans og gliacellekerner.

Kromsyre: Slet farvet, dog med lidt tydeligere tegning af Nissl-substansen og af ependymcellens kromatin i forhold til samme præparat behandlet med 1 n. syre.

Trikloreddikesyre: Minder mest om saltsyre- og salpetersyrepræparat og er i alle tilfælde ikke væsentligt bedre.

De øvrige præparater (svovlsyrling, fosforsyre, myresyre, mælkesyre og citronsyre) er meget ensartede i henseende til de forskellige vævselementers farvning.

Ved sammenligning med præparater indenfor denne gruppe med de 1 n. syrebehandlede præparater, ses der således en bedre farvning af samtlige præparater,

mest udtalt for de totalt dissocierede syrer, mindre for de middelstærke syrer, og næsten ikke for de organiske syrers vedkommende.

Præparaterne er ligeledes farveteknisk bedre end de tilsvarende 1 n. syrebehandlede præparater ved 4°, idet forskellen dog her er ret ensartet gennem hele syrerækken.

2 n. brugte syrer, stuetemperatur.

Saltsyre, salpetersyre, kromsyre og trikloreddikesyre: Næsten ufarvede, dog i den sidste med antydning af ependymcellekernefarvning.

Eddikesyre: Kraftig farvning af ependymcellernes kerner. De øvrige elementer er middelstærkt farvede.

De resterende præparater (svovlsyrling, fosforsyre, myresyre, mælkesyre og citronsyre) viser en forbavsende dårlig farvning af såvel kromatin som af kromatoide substanser. Man får herved mistanke om, at gallocyaninfarvningen i disse tilfælde har været mindre vellykket. På den anden side er de tilsvarende kernepræparater farvet som sædvanligt, hvorfor den dårlige farvning af de sidstnævnte præparater må antages at bero på syrebehandlingen. Årsagsforholdet er ikke klart.

Kernepræparaterne i denne gruppe svarer iøvrigt nøje til kernepræparaterne i gruppen: 2 n. syrer, overafkalkede; mindre til: 2 n. syrer, ikke overafkalkede, end man skulle have ventet.

1 n. brugte syrer ved stuetemperatur.

Kromsyre: Dårligste præparat, hvor der næsten ikke ses gliacellekerner. Ependymcellekernerne er svagt farvede og udflydende, kernepletten er kun antydet og cytoplasmaet er svagt diffust gråblåt, med antydede Nissl-granula.

Salpeter- og saltsyre: Middel farvning af ependymcellekerner, medens gliacellekernerne er svagt farvede, omend forholdsvis distinkte. Ved stor forstørring ses gangliecellerne som gråblå klatter med lyst kernelegeme og med en forholdsvis svagt farvet kerneplet. Ved større forstørring ses svagt tegnet Nissl-substans.

Trikloreddikesyre: Farveintensitet af gliacellekerner, ependymcellekerner og kernepletter som i de to foregående præparater. Nissl-substansen er bedre og mere kontrastrigt tegnet end i disse.

De øvrige præparater viser i henseende til farvning og kontrast ensartede forhold. Der er dog nogen medfarvning af ikke kromatoide substanser i svovlsyrling-, fosforsyre- og citronsyrepræparaterne.

Ved sammenligning mellem præparaterne af denne gruppe med de, der er behandlet med 1 n., ikke brugte syrer findes ingen overbevisende forskel på præparaterne, der har været behandlet med saltsyre, salpetersyre, fosforsyre og svovlsyrling, medens der for kromsyrens vedkommende ses en anelse stærkere farvetone i ependymcellernes kerner.

Ved sammenligning mellem trikloreddikesyrepræparaterne i de nævnte grupper findes heller ingen forskelle. Derimod ses ved sammenligning mellem de øvrige, organisk syrebehandlede præparater og særligt for eddikesyrens vedkommende en mere intens farvning af kernekromatin og Nissl-substans i de præparater, som har været udsat i brugte syrer, i forhold til de præparater, der har været i ikkebrugte syrer.

1 n. brugt eddikesyre, myresyre, mælke- og citronsyre viser i forhold til de tilsvarende, afkølet til 4° ingen væsentlige forskelle i præparaternes udseende.

1 n syrer 33°

Saltsyre og salpetersyre: Middel og distinkt farvning af ependymcellekernernes kromatin. Gliacellerne er slet farvede, nukleolus i gangliecellerne er kun lige antydet. Gangliecellernes protoplasma har en grålig tone, og der ses ikke Nissl-granula.

Kromsyre: Dårligere farvning af ependymcellernes kromatin og af gliacellekernerne. Gangliecellernes protoplasma har antydning af blå tone. Hist og her anes spor af Nissl-substans.

Trikloreddikesyre: Stærkere farvning af samtlige elementer i forhold til de tre foregående. Gangliecellernes cytoplasma er ensartet gråligt, uden antydning af Nissl-substans, hvorimod kernepletten er nogenlunde antydet.

De øvrige syrer viser væsentlig bedre kvalitet end de forannævnte.

Svovlsyrling: Ependymceller distinkt og middelsvært farvet. Gliacellekerner middelstærkt farvede. Kerneplet tydelig. Nissl-substansen pænt tegnet, af middelstærk intensitet, i særdeleshed sammenlignet med myresyreformiatbl. præp. nr. 10, som er af en meget dybere mørkblå tone.

Fosforsyre: Farveintensitet af de forskellige elementer noget over middel og i intensitet næsten på højde med myresyre bl. 10. præp. Nissl-substansen er dog ikke så distinkt tegnet, tilsyneladende som følge af diffus medfarvning af protoplasmaet.

Myresyre, mælkesyre og eddikesyre: Er i farvningens distinkthed og intensitet på højde med hinanden. Ependymceller, gliacelle-kerneplet og Nissl-substans er over middel farvede.

Citronsyre: Viser intens tegning af gangliecellerne med indhold, med nogen tendens til diffusering. Gliacellekernerne er under middel farvede. Ependymceller i citronsyrepræparatet er nok middelstærkt farvet, men med fuldstændigt udflydende cellegrænser.

De sidste organisk syrebehandlede præparater er alle mindre intenst farvede end det ikke syrebehandlede kontrolpræparat.

1 n. syrer ved 4°.

Kromsyre: Slet farvning af samtlige 4 vævskomponenter, men dog med noget bedre Nissl-tegning end i det tilsvarende præparat ved stuetemperatur og meget bedre end i præparatet ved 33°.

Trikloreddikesyre: Langt bedre farvekvalitet af samtlige elementer i forhold til det tilsvarende præparat ved 33° og væsentligt bedre end præparat ved stuetemperatur.

For de øvrige præparater gælder, at farvekvaliteten især for salpetersyre- og saltsyrepræparatet er forbavsende god. Begge disse præparater viser middelstærkt farvede ependymcellekerner, gliacellekerner, kerneplet og Nissl-substans. Fosforsyre, svovlsyrling, myresyre, eddikesyre, mælkesyre og citronsyre er faktisk på højde med hinanden, idet der i farveintensiteten kun er ubetydelig forskel mellem de organiske syrer og de middelstærke uorganiske syrer.

Ved sammenligning af ovenstående præparater med præparaterne i gruppen myresyreformiatblanding nr. 1—10 ved stuetemperatur ses, at ingen af 4°-præparaterne kommer på højde med myresyreformiatpræparaterne. Sidstnævnte er af en dybere blå og mere distinkt farvning, ligesom gliacellekernerne utvivlsomt er mørkere i tonen.

Ren myresyre (10-20-40-80%), myresyre- og salpetersyreblandinger.

10, 20 og 40% myresyre: Fortrinlig farvning af ependymcellekerner, gliacellekerner, kerneplet og Nissl-substans. Konc. myresyre giver kun middelmådig farvning, dårligst for gliacellekernernes vedkommende, men også Nissl-substansen viser kun pletvis farvning.

Myresyreformiat: Farvning af samtlige elementer af samme kvalitet som 10, 20 og 40% syrer, måske noget mere distinkt end disse, men af samme farveintensitet.

Myresyrecitrat: Svarer i såvel farveintensitet som -kvalitet til koncentreret myresyrepræparat.

Myresyrealkohol: Svarer til myresyrecitratpræp. Farvetonen af samtlige vævselementer er mere rødlige end ellers.

Salpetersyre-alkohol: Middelstærk ependymcellekernefarvning, svage gliacellekerner og fuldstændigt manglende Nissl-tegning. Kernepletten kan enkelte steder skimtes.

Salpetersyre-formol: I alle henseender mere ødelæggende for vævsfarvningen end den tilsvarende 1 n. salpetersyre ved stuetemperatur.

Salpetersyre-floroglucin: I forhold til 1 n. salpetersyre ses en noget svagere gliacelletegning, en ligeså stærk ependymcellekernetegning og en ikke så lidt bedre Nissl-substanstegning. Hertil kommer, at cellekernerne i dette præparat har en renere blå farvetone end sædvanligt.

Myresyreformiatblandinger nr. 1—10 ved stuetemperatur.

Ved sammenligning af præparaterne i denne gruppe efter farvning med *Einarsons* gallocyanin-chromalunlak ses gliacellekerner, ependymcellekerner, kerneplet og Nissl-substans af ensartet, distinkt dybblå farvning uden påviselige forskelle.

Ved sammenligning med tilsvarende myresyreformiatblandinger nr. 5—10, overafkalkede, findes fuldstændigt identiske farvninger af de 4 vævselementer.

Farveteknisk står præparaterne fra myresyreformiatblanding nr. 1—10 på højde med kontrolpræparatet, hvor der dog er større medfarvning, således at kontrasten i de førstnævnte præparater faktisk bliver bedre.

1 n. syrer, stuetemperatur, overafkalkning.

Saltsyre og salpetersyre: Tålelig farvning af ependymcellekerner. Gliacellekerner meget svage. Gangliecellerne viser kun antydet kerneplet, ingen Nissl-substans.

Kromsyre: Yderst slet farvet, ligner det 1 n. syrebehandlede præparat ved stuetemperatur.

Trikloreddikesyre: Svarer fuldstændig til saltsyre- og salpetersyrepræparatet med undtagelse af en svagt tegnet Nissl-substans.

Svovlsyrling, fosforsyre: Meget bedre end de foregående, idet samtlige vævselementer er middelstærkt og distinkt farvede.

Præparaterne fra de resterende, organiske syrer (myresyre, eddikesyre, mælke-, og citronsyre) er alle ensartet, distinkt og noget over middel farvede. De udmærker sig i forhold til de to foregående syrer ved en mere dybblå tone og større kontrastrigdom i gliacellekerner og Nissl-substans.

Ved sammenligning med 1 n. syrebehandlede ses præparatet i denne gruppe (1 n. overafkalkede) at være mindre intenst farvede, med udtalt forskel for de totalt dissocierede syrers vedkommende, mindre udtalt, men tydelig, for de middelstærke syrers vedkommende og forholdsvis ringe for de organiske syrers vedkommende.

2 n. syrer, overafkalkning, stuetemperatur.

Salpetersyre og saltsyre: Ganske svag farvning af ependymcellekernerne, medens de øvrige elementer er ufarvede.

Trikloreddikesyre: Alle elementer ufarvede undtagen ependymcellekernerne, som er svagt antydede.

Kromsyrepræparatet: Er gået til grunde under forsøget.

Fosforsyre og svovlsyrling: Middelfarvning af ependymcellernes kerner og forholdsvis svagere farvning af gliaceller, kerneplet og Nissl-substans end det ellers er tilfældet med disse to syrer. Farvningen er endog væsentligt ringere end ved de tilsvarende 1 n. syrer.

Citronsyre: Farvning af Nissl-substansen svarer til svovlsyrling- og fosforsyrepræparatet, medens gliacellekerner og i særdeleshed ependymcellekerner er væsentligt dårligere farvede.

Myresyrepræparatet: Langt det bedste i gruppen hvad angår de fire forskellige vævselementers farvning. Det står ikke tilbage for det tilsvarende præparat behandlet med 2 n. syre uden overafkalkning.

Eddikesyre og mælkesyre: Indtager et mellemtrin mellem de middelstærke syrer (samt citronsyre) og myresyre, dog således at de i henseende til Nissl-substansens farvning mest nærmer sig de førstnævnte syrer. Sammenlignet med de ikke overafkalkede 2 n. syrepræparater ses der således en kraftig formindsken af farvbarheden efter påvirkning med eddikesyre, mælkesyre, trikloreddikesyre, fosforsyre og svovlsyrling særlig udtalt for de sidste tre syrers vedkommende.

Kromsyrepræparatet var ødelagt.

Salpetersyre- og saltsyrepræparaterne var ligeså dårlige som de ikke overafkalkede. Myresyren hævdede sig, ene af dem alle, ved at være ligeså god som i det ikke overafkalkede præparat.

Myresyreblanding 5—10, overafkalkning, 3 n. salpeter- og eddikesyre og samme syrer med 0.05 mol. lanthan.

Myresyreformiatblandinger nr. 5—10, overafkalkning: Ingen sikre forskelle på farvningen af gliacellekerner, ependymcellekerner, ganglieceller, Nissl-granula eller kerneplet.

3 n. salpetersyre: Velbevarede ependymceller med distinkt farvet kromatin. Gliacellekernerne er væsentligt svagere farvet, og spinalganglierne er bortset fra antydet kerneplet fuldstændigt ufarvede, uden antydning af Nissl-granula.

Lanthannitrat-salpetersyre: Nøjagtigt samme farvelighed af de forskellige elementer som ovenstående afkalkningsmiddel.

3 n. eddikesyre: Meget mørktfarvede ependymcellekerner. Det samme gælder gliacellekernerne. Nissl-substansen er veludtalt med nogen tendens til sammenflyden.

Lanthanacetat-eddikesyre: Farvbarheden af de 4 elementer som foregående.

Ved sammenligning af formiatblanding nr. 10, overafkalket, og lanthanacetat-eddikesyre ses der ingen væsentlige forskelle i farveintensitet.

FIXATION-AFKALKNING

(Undersøgelser over skrumpninger af nyre- og levervæv fra modelforsøg II, IV og V) (us. i sammenligningsmikroskop, kontrol med okularmikrometer)

Modelforsøg II

(Fixation i Kaformacet)

Nyrevæv (kernestørrelse i tubuli contorti og samlerør sammenlignet med tilsvarende i kontrolpræparatet, der ikke har været i syre). Celler og kapselrum umulige at bedømme.

Kromsyre: Kernefarvningen meget dårlig. Hvor kernerne kan ses, er der udtalte skrumpninger af disse.

Svovlsyre: Kernefarvningen ligeledes slet, i forbindelse med udtalt skrumpning (lige så udtalt som i foregående præparat).

Saltsyre: Moderat svind af kernerne, tydeligst at se i samlerørene.

Salpetersyre: do. do.

Trikloreddikesyre: Kernefarvningen mindre god. Der findes skrumpning af kernerne, lidt mindre end i de to foregående syrer.

Svovlsyrling: Kernerne står nydeligt, og der er næsten intet kernesvind at konstatere.

Citronsyre: Ligesom i de to følgende præparater ses en overordentlig smuk kernefarvning. Der er dog en svag, men utvivlsom skrumpning af kernerne (svarende til svovlsyrling).

Myresyre og mælkesyre: Meget smuk kernefarvning uden nukleære skrumpninger.

Konklusion: Kernerne i kaformacetfixeret nyrevæv påvirket med forskellige syrer viser ved sammenligning med et ikke-syrebehandlet nyrestykke fra samme nyre, at kromsyre og svovlsyre giver udtalte skrumpninger. De øvrige, stærke, uorganiske syrer: Saltsyre og salpetersyre, giver moderat skrumpning af kernerne. Svovlsyrling og den stærke organiske syre, trikloreddikesyre, giver svage, men utvivlsomme skrumpninger, medens de resterende organiske syrer, mælkesyre og citronsyre ikke giver anledning til skrumpning af kernerne.

Levervæv

Kromsyre: Kernerne næsten ufarvede, med meget udtalt skrumpning.

Svovlsyre: Næsten ingen kernefarvning. Der er udtalt skrumpning af kernerne.

Saltsyre: Let svind af kernerne. Farvningen af kernerne kun nogenlunde.

Salpetersyre: Forhold som foregående.

Trikloreddikesyre: Farvningen udmærket. Der er næsten intet kernesvind.

Svovlsyrling: Som foregående.

De resterende organiske syrer (myre-, mælkesyre og citronsyre) giver overhovedet ikke kernesvind.

Konklusion: De uorganiske syrer giver svind af kerner, mest udtalt for de stærkestes vedkommende. Desuden nogen skrumpning i det trikloreddikesyrepåvirkede præparat. Der er ingen skrumpninger i de med svage, organiske syrer behandlede præparater.

Modelforsøg IV

(Fixation i Susa)

Nyrevæv

Svovlsyre: Kernefarvningen er meget dårlig, men det er dog overordentligt tydeligt, at der er skrumpning af kernerne i samtlige kategorier af tubuli.

Saltsyre: Kernefarvningen ikke særligt fremragende. Der er ringe skrumpning af kernerne.

Salpetersyre: Som foregående.

Trikloreddikesyre: Kernefarvningen noget dårlig. Der er minimalt svind af kernerne.

Svovlsyrling: Kernefarvningen antagelig. Som i foregående præparat er der minimalt svind af kernerne.

Citron
Mælke } syre: Intet kernesvind.
Myre

Konklusion: Ved sammenligning med kontrolpræparatet fra de kaformacetfixerede ses for det første, at der er noget mindre skrumpning i kontrolpræparatets kerner efter susa-fixation. Endvidere er skrumpningen som helhed noget mindre i samtlige syrebehandlede præparater, der er susa-fixerede, selvom forskellene ikke er særligt udtalte. De stærke uorganiske syrer samt den stærkere organiske syre, trikloreddikesyre, giver skrumpning. De øvrige organiske syrer giver ingen skrumpning i kernematerialet.

Modelforsøg IV (Fixation ctr. af kalkning)

(Fixation med Susa)

Lever

Svovlsyre: Kernefarvningen yderst slet. Der er udtalt skrumpning af kernerne.

Saltsyre: Tydeligt svind af kernerne, omend ikke nær så udtalt som i foregående præparat. Kernefarvningen er kun nogenlunde.

Salpetersyre: Som foregående.

Trikloreddikesyre: Kernefarvningen kun nogenlunde. Der er ganske let svind af kernernes størrelse.

Svovlsyrling: Farvningen af kernerne er udmærket. Der er minimalt svind af kernestørrelsen, nærmest som i foregående præparat.

Citronsyre: Overordentlig smuk kernefarvning, men der er en anelse af kernesvind, nærmest som i svovlsyrlingen.

Mælkesyre og myresyre: Fortræffelige kernefarvninger uden svind af kernestørrelsen.

Konklusion: Skrumpning af kerner er konstateret efter de samme syrer som i den tilsvarende undersøgelsesrække for nyrevæv, d. v. s. i præparater, der har været behandlede med de stærke uorganiske syrer samt den relativt stærke trikloreddikesyre. Så godt som ingen skrumpning efter svovlsyrlingen, overhovedet ingen skrumpning efter de svage organiske syrer.

Der er ikke konstateret sikker forskel på kernestørrelsen i kaformacet- og susafixeret væv, hverken i de syrebehandlede præparater eller i kontrolpræparaterne.

Modelforsøg V

(Fixation i Carnoy-Lebrun)

Nyrevæv:

Svovlsyre: Der kan næsten ikke ses kernefarvning undtagen i samlerørene, hvor der er meget tydelig skrumpning af kernerne.

Saltsyre: Kernefarvningen nogenlunde. Der er så godt som ingen skrumpning af kerner.

Salpetersyre: Kernernes størrelse som i foregående præparat.

Hverken efter svovlsyrling, trikloreddikesyre, mælkesyre, myresyre eller citronsyre kan der konstateres skrumpning af kernerne af betydning.

Konklusion: I denne række ses mindst skrumpninger i samtlige præparater sammenlignet med præparaterne fixerede med Kaformacet og Susa vædske, men til gengæld er de Carnoy-fixerede præparater tillige med kontrolpræparatet i forvejen stærkt skrumpede, således at mulighederne for yderligere kernesvind er minimale.

Modelforsøg V. (Fixation ctr. afkalkning)

(Fixation med Carnoy-Lebrun)

Lever:

Ved sammenligning mellem det Carazzi-farvede kontrolpræparat fra denne række med kontrolpræparaterne fra de to andre fixationsrækker ses en mere distinkt farvning af kernerne i førstnævnte samtidig med en meget tydelig skrumpning af kerneelementerne.

Svovlsyre: Der er praktisk talt ingen farvning af kerner. Enkelte steder kan man dog skimte omrids af kerner, som er meget skrumpede.

Saltsyre: Minimal skrumpning af kernerne. Kernefarvningen er meget dårlig.

Salpetersyre: Som foregående præparat.

Trikloreddikesyre: Der ses antydning af skrumpning af kernerne. Kernefarvningen er kun nogenlunde.

De øvrige præparater (svovlsyrling, myresyre, mælkesyre og citronsyre) viser gode kernefarvninger uden skrumpninger.

Konklusion: Også her ses som ved nyrevæv, at der ikke er væsentlige forskelle på kernestørrelsen af de afkalkede præparater, bortset fra svovlsyrepræparatet.

Imidlertid er kernerne som før nævnt meget skrumpede i forhold til anderledes fixerede præparater.

FORSØG OVER VOLUMENÆNDRINGER I TILSLUTNING TIL AFKALKNING

1) I tilslutning til afkalkning med HNO_3 og HCOOH—HCOOHNa.

(Begyndt 28.10.47)

Til forsøget er anvendt 6 knoglestykker fra substantia compacta fra hesteforpibe, af størrelse $\frac{1}{2} \times 2\frac{1}{2}$ cm, så de kunne gå gennem halsen på et 10 cc-pyknometer. Om teknikken iøvrigt, se teksten. Pyknometer + vand (TARA) før og efter vejningerne: 22.665 g.

Før afkalkningen

Myresyre	23.175 g	— 22.925 g	= 0.250 g
	23.183 -	— 22.927 -	= 0.256 -
	23.229 -	— 22.953 -	= 0.276 -
Salpetersyre	23.168 -	— 22.918 -	= 0.250 -
	23.266 -	— 22.968 -	= 0.298 -
	23.101 -	— 22.883 -	= 0.218 -

Efter afkalkningen

Myresyre	22.938 g	— 22.707 g	= 0.231 g	(— 0.019)
	22.944 -	— 22.703 -	= 0.241 -	(— 0.015)
	22.967 -	— 22.706 -	= 0.261 -	(— 0.015)
Salpetersyre	22.928 -	— 22.697 -	= 0.231 -	(— 0.019)
	22.987 -	— 22.703 -	= 0.284 -	(— 0.014)
	22.900 -	— 22.693 -	= 0.207 -	(— 0.011)

Inden vejningen forsigtig aftrykken af præparaterne for vand.

2) I tilslutning til afkalkning med de samme syrer, med eller uden efterbehandling med natriumsulfat, 5% vandig opløsning.

(Begyndt 5.11.47)

Pyknometer + vand (TARA) før og efter vejningerne: 22.665 g.

Før afkalkningen

Salpetersyre	1.....	23.146 g	— 22.905 g	= 0.241 g
	2.....	23.200 -	— 22.931 -	= 0.241 -
	3.....	23.216 -	— 22.940 -	= 0.276 -
	4.....	23.145 -	— 22.904 -	= 0.241 -
Myresyre	5.....	23.923 -	— 22.977 -	= 0.316 -
	6.....	23.179 -	— 22.919 -	= 0.260 -
	7.....	23.140 -	— 22.902 -	= 0.238 -
	8.....	23.167 -	— 22.916 -	= 0.251 -

HNO_3: 1–4
1–2 vand
3–4 natriumsulfat

HCOOH bl.: 5–8
5–6 vand
7–8 natriumsulfat

Efter afkalkningen og efterbehandlingen

1..... 22.918 g — 22.688 g = 0.230 g (— 0.011)
2..... 22.946 - — 22.693 - = 0.253 - (— 0.016)
3..... 22.953 - — 22.962 - = 0.261 - (— 0.015)
4..... 22.915 - — 22.688 - = 0.227 - (— 0.014)
5..... 23.029 - — 22.724 - = 0.305 - (— 0.011)
6..... 22.944 - — 22.696 - = 0.248 - (— 0.012)
7..... 22.917 - — 22.692 - = 0.225 - (— 0.013)
8..... 22.932 - — 22.693 - = 0.239 - (— 0.012)

FORSØG OVER VOLUMENÆNDRINGER I TILSLUTNING TIL AFKALKNING MED ELLER UDEN BEHANDLING MED LITIUMSULFAT

(Påbegyndt 5.5.48)

Pyknometer + vand (TARA) = 22.665 g

Lever	1	HNO_3	H_2O	0.305 g — 0.012 = 0.293 g
	2		Li_2SO_4	0.282 - — 0.019 = 0.263 -
	3			0.377 - — 0.022 = 0.355 -
	4	HCOOH bl.	H_2O	0.415 - — 0.023 = 0.392 -
	5		Li_2SO_4	0.459 - — 0.022 = 0.437 -
	6			0.327 - — 0.010 = 0.317 -
Rygmarv	7	HNO_3	H_2O	0.171 - — 0.005 = 0.166 -
	8		Li_2SO_4	0.141 - — 0.002 = 0.139 -
	9			0.143 - — 0.003 = 0.140 -
	10	HCOOH bl.	H_2O	0.117 - — 0.000 = 0.117 -
	11		Li_2SO_4	0.193 - — 0.002 = 0.191 -
	12			0.131 - — 0.000 = 0.131 -
Lever	13	HNO_3	H_2O	0.293 - — 0.010 = 0.283 -
	14	HCOOH bl.	H_2O	0.320 - — 0.012 = 0.308 -
Rygmarv	15	HNO_3	H_2O	0.086 - + 0.001 = 0.087 -
	16	HCOOH bl.	H_2O	0.083 - + 0.002 = 0.085 -

Efter afkalkning og efterbehandling

		% af oprindelige volumen
1.....	0.284 g — 0.008 = 0.276 g (— 0.017)	— 5.8
2.....	0.249 - — 0.009 = 0.240 - (— 0.023)	— 8.7
3.....	0.338 - — 0.012 = 0.326 - (— 0.029)	— 8.2
4.....	0.386 - — 0.016 = 0.370 - (— 0.022)	— 5.6
5.....	0.418 - — 0.011 = 0.407 - (— 0.030)	— 6.9
6.....	0.307 - — 0.006 = 0.301 - (— 0.016)	— 5.0
7.....	0.193 - — 0.003 = 0.190 - (+ 0.024)	+ 15.5

8.....	0.175 -	— 0.004 = 0.171 -	(+ 0.032)	+ 23.0
9.....	0.185 -	— 0.003 = 0.182 -	(+ 0.042)	+ 30.0
10.....	0.154 -	— 0.006 = 0.145 -	(+ 0.031)	+ 26.5
11.....	0.226 -	— 0.005 = 0.221 -	(+ 0.030)	+ 15.7
12.....	0.153 -	— 0.000 = 0.153 -	(+ 0.022)	+ 16.8
13.....	0.278 -	— 0.013 = 0.265 -	(— 0.018)	— 6.4
14.....	0.303 -	— 0.006 = 0.297 -	(— 0.011)	— 3.6
15.....	0.111 -	— 0.003 = 0.108 -	(+ 0.021)	+ 24.1
16.....	0.109 -	+ 0.003 = 0.112 -	(+ 0.027)	+ 31.7

Tallene i sidste forsøgsrække refererer til tallene i talkolonnerne ovenover. Skrumpningen (—) og svulsten (+) er beregnet i % af det oprindelige volumen (se sluttallene ovenfor).

Præparaterne fra foregående forsøg føres langsomt igennem til absolut alkohol, hvorefter der pâny foretages måling af volumen, dog således at volumen nu bestemmes ved den fortrængte mængde alkohol: alkoholens vægtfylde. Denne størrelse er lig vægten af det tilsvarende volumen vand, som jeg fremdeles regner lig det sande volumen af den fortrængte vædskemængde (= volumen af det undersøgte vævsstykke).

Nedenstående nummerering er den samme som i rækkerne ovenfor.

Pyknometer + absolut alkohol (TARA) = 20.315 g.

Nr.				
1.....	0.247 g — 0.030 = 0.217 g	(0.271)	= — 0.022	— 7.5
2.....	0.210 - — 0.013 = 0.197 -	(0.247)	= — 0.046	— 17.5
3.....	0.283 - — 0.025 = 0.258 -	(0.323)	= — 0.032	— 9.0
4.....	0.326 - — 0.030 = 0.296 -	(0.370)	= — 0.022	— 5.6
5.....	0.365 - — 0.035 = 0.330 -	(0.415)	= — 0.021	— 4.8
6.....	0.266 - — 0.027 = 0.239 -	(0.299)	= — 0.018	— 5.7
7.....	0.138 - — 0.008 = 0.130 -	(0.165)	= — 0.001	— 0.6
8.....	0.120 - — 0.018 = 0.112 -	(0.140)	= — 0.001	— 0.7
9.....	0.129 - — 0.009 = 0.120 -	(0.150)	= + 0.010	+ 7.1
10.....	0.106 - — 0.007 = 0.099 -	(0.124)	= — 0.007	— 6.0
11.....	0.164 - — 0.016 = 0.148 -	(0.185)	= — 0.006	— 3.1
12.....	0.107 - — 0.007 = 0.100 -	(0.125)	= — 0.006	— 4.6
13.....	0.235 - — 0.017 = 0.218 -	(0.273)	= — 0.010	— 3.5
14.....	0.260 - — 0.018 = 0.242 -	(0.303)	= — 0.005	— 1.6
15.....	0.068 - — 0.003 = 0.065 -	(0.083)	= — 0.004	— 4.6
16.....	0.076 - — 0.007 = 0.069 -	(0.086)	= — 0.001	— 1.2

Tallene i parantes er de fra alkohol til vand omregnede vægtmængder = volumen af det målte vævsstykke. Tallene i kolonnen derefter angiver + — variation i forhold til det oprindelige volumen (se foregående side), idet + betyder svulst af vævet, — betyder skrumpninger af vævet.

FORSØG OVER FIXATIONEN

Ved de sammenlignende undersøgelser over organer fra intravitalt fixerede marsvin blev labyrintherne anvendt til de senere omtalte indlejringsforsøg.

Med henblik på bedømmelsen og også for at få et ensartet materiale til afkalkningen blev der 12.11.47 iværksat en intravital gennemskylning på 12 marsvin i alderen 4–5 mdr. og af en vægt på ca. 400 g.

De anvendte fixationsvædsker var følgende:

Alkoholiske: Carnoy, sublimatalkohol og Kaformisal.

Formolholdige: 10% formol, Kaformacet.

Kromholdige: Kaformisal, Kaformacet.

Sublimatholdige: Susa og sublimatalkohol.

Sammensætningen var følgende:

Formol: 10% vandig formalin (pH = 3.4).

Kaformacet: 425 cc. 5% kaliumdikromat, 50 cc. 40% formalin, 25 cc. ren iseddike, 500 cc. destilleret vand (pH = 3.0).

Kaformisal: 125 cc. 5% kaliumdikromat, 25 cc. ren iseddike, 50 cc. 40% formalin, 300 cc. 96% alkohol (pH = 3.5).

Susa: sublimat g. 25, natriumklorid g. 5, vand 800 cc., trikloreddikesyre g. 20, iseddike cc. 40, formalin 40% cc. 200 (pH = 1.05).

Sublimatalkohol: sublimat g. 15, natriumklorid g. 25, 50% alkohol 500 cc. (pH = 5.4).

Carnoy: lige dele abs. alkohol, iseddike og kloroform (pH = 1.8).

Formol I:	Yderst vellykket	Formol II:	Vellykket
Kaformacet I:	Yderst vellykket	Kaformacet II:	Fortræffelig
Kafisal I:	Fortræffelig	Kafisal II:	Yderst vellykket
Susa I:	Yderst vellykket	Susa II:	Fortræffelig
Sublimatalkohol I:	Yderst vellykket	Sublimatalkohol II:	Fortræffelig
Carnoy I:	Vellykket	Carnoy II:	Vellykket

Fixationen med denne vædske foregår uhyre hurtigt, idet dyrene i løbet af ca. 10 sekunder er fuldstændigt stive i alle lemmer.

Labyrinthen udtages til mikroskopi og forskellige farvninger.

Nyrevævet udtages til kontrol af fixationen, der efter gennemskylningernes forløb bør være fortræffelig.

Vævene efterfixeres 1 døgn og får herved følgende udseende:

Formolpræparaterne	blege
Kaformacetpræparaterne	mørkt græsgrønne
Kaformisalpræparaterne	lyst græsgrønne
Susapræparaterne	kridhvide
Sublimatalkohol	blege, lignende formolpræparaterne
Carnoy	opsvulmede, gelatinøse

Der foretages ingen hærdning i alkohol inden afkalkningen af labyrintherne påbegyndes.

FORSØG OVER LABYRINTHAFKALKNING

Labyrinthafkalkning I.

(Påbegyndt 27.10.47 kl. 2400)

Der anvendes hertil tidligere intravitalt gennemskylningsfixerede labyrinther, som i nogen tid har stået i 70% alkohol. Hovederne skylles i vand i 24 timer, de saves igennem i to halvdele og det forreste parti af hovederne saves fra, så man har de to ossa temporalia fra hver side. Efter nummerering anbringes de tilsvarende halvdele dels i 1 n. salpetersyre, dels i myresyreformiatblanding nr. 10.

Foto (rtg.) 150 kv, 50 ma, afst. 100 cm 0.35 sec., fremkaldelse: 7 min.

Myresyre.....	1. afsl. 28.10. kl. 0800		32 timer
	2. — 30.10. kl. 1200		$3\frac{1}{2}$ døgn
	3. — 30.10. kl. 1200		$3\frac{1}{2}$ døgn
	4. — 29.10. kl. 0800	afbrudt 0800—1700 (28.10.)	
	5. — 3.11. kl. 0800		>1 uge
	6. — 3.11. kl. 0800		>1 uge
Salpetersyre ..	1. — 27.10. kl. 1600		16 timer
	2. — 29.10. kl. 0800	afbrudt 2 timer	45 timer
	3. — 29.10. kl. 0800		45 timer
	4. — 27.10. kl. 1600		16 timer
	5. — 3.11. kl. 0800	afbrudt 2 timer	>1 uge
	6. — 3.11. kl. 0800		>1 uge

Afkalkningstider ret forskellige på grund af forskelle i dyrenes alder.

Derfor blev der fremskaffet 12 nye dyr fra Statens Seruminstitut 4–5 måneder gamle og af en vægt på ca. 400 g. Dyrene blev intravitalt fixerede og derefter uden forudgående hærdning underkastet:

Labyrinthafkalkning II.

Der anvendtes de samme syrer og iøvrigt samme fremgangsmåde med at anbringe den ene hovedhalvdel i salpetersyre og den tilsvarende halvdel i myresyreformiatblanding nr. 10.

Afkalkningen foregik meget ensartet og tiderne blev følgende (beg. 15.11.47):

Salpetersyre: Ca. 1 døgn.

Myresyrebl. 10: Ca. 2 døgn. (pH af denne 2.2 før og efter afkalkningen (god stødpude)).

Labyrinthafkalkning III.

Efter resultatet af Nissl-farvning i forsøg no. XII (4° C.), foretages der også et forsøg over afkalkning med salpetersyre og saltsyre, 1 normale, ved denne temperatur.

Der fotograferes daglig, og det viser sig at afkalkningen på denne måde varer

ialt tre døgn. Nissl-substansen kan ikke fremstilles ved farvning med *Einarsons* gallocyaninkromalunlak.

LABYRINTHUNDERSØGELSER

Gallocyaninfarvning af labyrinther gennemskyllet med forskellige fixativa og afkalket i 1 n. salpetersyre og myresyre-formiatblanding.

Undersøgelse dels af Nissl-substansfarvningen — dels af kernefarvningen. Nissl-substansen undersøges i ganglion spirale, og i de store, multipolare ganglieceller i det vedhængende stykke cerebrum.

Myresyre-natriumformiatafkalkede præparater:

Kaformacet: Kernefarvningen er middelstærk, for knoglemarvens vedkommende over middel. De multipolare ganglieceller i hjernesubstansen viser distinkt og kraftigt farvet Nissl-substans på ufarvet baggrund. Nissl-substansen i ganglion spirale er veludtalt og skarp på baggrund af svagt medfarvet cytoplasma. Nissl-substansen findes lejret dels som store brokker i cytoplasmaet dels som kernekapper.

Kaformisal: Præparatet viser middelstærk kernefarvning og meget kraftig farvning af knoglemarvens celler. De multipolare ganglieceller i hjernen viser en kraftig og distinkt Nissl-substans med antydningsvis medfarvning af baggrunden. Spiralganglieceller syner noget kraftigere farvede end i foregående præparat, et forhold, som dog væsentligst skyldes medfarvning af cytoplasmaet. Lejringen af Nissl-substansen som ovenfor omtalt.

Susa: Viser middelstærk kernefarvning. Der findes ikke knoglemarv i præparatet. Der er en del sublimatudfældninger i præparatet (disse ikke fjernede, for ikke at indføre nye fejlkilder). Nissl-substansen i hjernens store ganglieceller er dårligt farvet. Farvningen af spiralganglieceller nes Nissl-substans er noget bedre uden at komme på højde med farvningen i to foregående præparater.

Sublimatalkohol: Kraftig farvning af kernerne i labyrinthkapselens periost, men herudover er farvningen meget svag. De multipolare ganglieceller i hjernesubstansen viser Nissl-farvning som ikke afviger væsentlig fra fundet i foregående præparater. I sneglen står ganglieceller ne med lille forstørring som blå klatter på næsten ufarvet baggrund. Ved større forstørring ses Nissl-granula, som er udflydende på grund af udtalt medfarvning af cytoplasmaet.

Carnoy: Kernefarvning noget over middel, for de periostale lags vedkommende på højde med sublimatalkoholpræparaterne. Hjernevævet er præget af udbredte og udtalte intercellulære ødemer. Nissl-substansen står forbavsende distinkt tegnet på næsten ufarvet baggrund, og står således i farveteknisk henseende ikke meget tilbage for kaformacet- og kaformisal-præparaterne. Også i spiralganglieceller ne findes ret tydelig Nissl-substans, omend noget sløret som følge af medfarvning af protoplasmaet. Ligesom i hjernesubstansen ses spredte vædskeudtrækninger imellem nervetrådene i nervus cochlearis.

Formalin: Ligesom i foregående præparat ses en ret intens kernefarvning nogenlunde ligeligt gældende for alle cellearter. Spiralganglieceller ne træder derfor ikke særligt frem i forhold til omgivelserne. Nissl-substansfarvningen er meget dårlig og uensartet med udtalt medfarvning af cytoplasmaet.

Salpetersyreafkalkede præparater.

Kaformacet: Kernefarvningen er dårlig, på sine steder næsten ophævet. Knoglemarvsceller meget under middel farvede. I de talrigt forekommende multipolare ganglieceller i storhjernen findes der oftest ikke antydning af Nissl-substans. Enkelte steder kan man skelne spor af grovere brokker. Spiralganglieceller står meget svagt tegnede og er på ganske få undtagelser nær uden indhold af Nissl-substans.

Kaformisal: Kernefarvningen dårlig, også for knoglemarvens vedkommende. Hjernens multipolare ganglieceller er næsten usynlige i præparatet og uden indhold af Nissl-substans. Spiralganglieceller er svagt tegnede (svagt blågrå) og uden indhold af Nissl-substans.

Susa: Kernefarvningen er dårlig, omend noget tydeligere end i de foregående præparater. Der findes især i hjernen talrige sublimatudfældninger. De multipolare ganglieceller viser nogle steder forbavsende tydeligt tegnet Nissl-substans, omend kvaliteten er ringe og slet ikke kommer på højde med billedet i det tilsvarende præparat afkalket med myresyreformiatblanding nr. 10. Spiralganglieceller er næsten ufarvede og indeholder kun for ganske enkelte cellers vedkommende spor af Nissl-substans.

Sublimatalkohol: Præparatet er næsten ufarvet med undtagelse af periostale cellekerner og kernerne i mellemøreslimhinden. De multipolare ganglieceller i hjernevævet er vanskelige at få øje på og uden indhold af Nissl-granula. Der findes som beskrevet under Carnoypræparatet intercellulære vædskeudtrædninger, væsentligst perifert i hjernevævet. Der findes ingen vædskeudtrædninger i nervus cochlearis. Spiralganglieceller er næsten usynlige og næsten helt uden indhold af Nissl-substans.

Carnoy: Kernefarvningen dårlig i samtlige celler, også i knoglemarven. Ret udtalte vædskeudtrædninger ses i hjernen og i nervus cochlearis. De multipolare ganglieceller kan kun skimtes hist og her som svagt gråblå klatter uden antydning af Nissl-substans. Spiralganglieceller præsenterer sig ligeledes næsten ufarvede og uden antydning af Nissl-substans.

Formalin: Kernefarvningen slet. De multipolare ganglieceller kan kun svagt anes og ses uden indhold af Nissl-substans.

Gallocyaninfarvningen på kaformacetfixerede labyrinther efter afkalkning med 1 n. salpetersyre og saltsyre ved 4° C.

Dette forsøg er en direkte følge af resultaterne i modelforsøgene over Nisslfarvningen med gallocyanin i rygmarvspræparater efter påvirkning af 1 n. salpetersyre og saltsyre ved 4° C.

Der fandtes nemlig ved hint forsøg en forbavsende godt bevaret Nissl-substans i begge præparater.

Ved undersøgelse af dette forsøgs labyrinthpræparater ses sammenlignet med de tilsvarende labyrinthpræparater, afkalket ved stuetemperatur kun en bedre udtalt grænse mellem kernemembran og cytoplasma i gangliecellerne. I lighed med de ved stuetemperatur afkalkede præparater ses ingen Nissl-substans.

Bøhmer-hæmatoxylinfarvning af labyrinther.

(Undersøgelse af præparatets farvbarhed som helhed og af fixationen af det Cortiske organ med hertil knyttede nervøse elementer)

Præparater afkalkede i myresyreformiatblanding no. 10:

Kaformacet: Udmærket farvning af samtlige vævselementer. Der er i dette præparat som i alle de følgende ganske lette skrumpninger af labyrinthen som følge af indlejringen i paraffin. Det Cortiske organ står smukt og klart. Der er ret udtalt afsmalning og afløsning af indre sulcusceller. Gangliecellerne tegner sig smukt og skarpt med tydelig afgrænsning af de forskellige celleformer.

Kaformisal: God farvning af de forskellige vævselementer. Det Cortiske organ præsenterer sig pænt med ret klart afgrænsede celler, men mindre skarpt tegnede kerner. I forhold til det foregående præparat ses såvel ydre som indre sulcusceller opblødte, eller mangler. Gangliecellerne svarer ret nøje til udseendet i forrige præparat.

Susa: Farvekvaliteten god. Cellerne i det Cortiske organ, som er vel fixeret, står nydeligt omend ikke helt så skarpt som for de to foregående præparaters vedkommende. Ydre og indre sulcusceller er ret høje, og der er ikke nogen afløsning af de inderste sulcusceller. Gangliecellerne står en anelse mindre klart end i de to foregående præparater og med forholdsvis smal pericellulær lys zone. Denne lyse zone er lidt større for Kaformisalens vedkommende, væsentligt større for Kaformacetens vedkommende.

Sublimatalkohol: Farvekvaliteten meget dårlig. Det Cortiske organ er fuldstændig opløst. Der findes opblødning af ligamentum spirale og opblødning og afløsning af stria vasculosa. Gangliecellerne ses som forholdsvis stærkt farvede k.atter uden tydelig distinktion mellem kerne og cytoplasma og omgivet af meget store, lyse pericellulære zoner.

Carnoy: Farvningen kun nogenlunde. Det Cortiske organ er opblødt og delvis opløst. Lignende forandringer ses i stria vasculosa. Resterne af det Cortiske organ er klemt ned af membrana Reissneri, der næsten overalt er bristet. Gangliecellerne viser noget mere tegning end i det foregående præparat, men adskiller sig ellers ikke væsentligt herfra.

Formalin: Farvekvaliteten er god. Derimod er det Cortiske organ med tilhørende indre og ydre sulcusceller mer eller mindre destrueret. Samme forandringer findes i mindre grad i stria vasculosa. Gangliecellerne er små, ret stærkt farvede uden tydelig overgang mellem kerne og protoplasma og med ret stor, lys pericellulær zone. Denne er dog ikke så udtalt som for de to foregående præparaters vedkommende.

I samtlige præparater er der konstateret fuldstændig blodtomhed i labyrinthens kar.

Salpetersyreafkalkede præparater.

Kaformacet: Farvekvaliteten kun nogenlunde. Det Cortiske organ og omgivelser som beskrevet under de tilsvarende myresyreformiatafkalkede præparater. Gangliecellerne ses med kerner, som er tydeligt afgrænsede fra protoplasmaet. Der er udvidede, lyse, pericellulære zoner.

Kaformisal: Farvningen som foregående præparat. Det Cortiske organ præsenterer sig på samme måde, dog lidt mere udvisket. I forhold til det myresyreformiatafkalkede præparat ses i gangliecellerne en slående forskel, idet der dels findes en udtalt forøgelse af den lyse, pericellulære zone og dels findes en udtalt udflyden mellem kernemembran og protoplasma.

Susa: Farvningen middelmådig. Konturerne ikke helt skarpe, især for sansecellernes vedkommende. Gangliecellerne viser en udvidelse af den omgivende lyse zone, og grænsen mellem kernemembran og cytoplasma er kun nogenlunde synlig.

Sublimatalkohol: Præparatet afviger ikke væsentligt fra det myresyreformiatafkalkede præparat. Farvningen er dog dårligere, og den lyse zone omkring gangliecellerne er noget større.

Samme forhold går igen i det carnoy- og formolfixerede præparat.

Marvskedefarvning ad modum Weil på labyrinther

a. Efter afkalkning i myresyreformiatbl. nr. 10:

Kaformacet: Udmærket farvning af marvskeder såvel i hjerne som i nervus cochlearis og fra og til gangliecellerne i ganglion spirale. Sidstnævnte celler tegner sig ganske pænt med Nissl-granula, kerne og kerneplet.

Kaformisal: God marvskedefarvning i hjerne, nervus cochlearis og i områder omkring gangliecellerne i ganglion spirale. Nissl-substans, kerne og kerneplet som i forrige præparat.

Susa: Marvskedefarvningen noget svagere end i de to forrige præparater, præsenterende sig bedst i tilslutning til spiralgangliecellerne. Sidstnævnte præsenterer sig overordentlig nydeligt, bedre end i de to foregående præparater.

I de følgende 3 præparater (sublimatalkohol, Carnoy og formol) lykkes marvskedefarvningen også udmærket, men frembyder som helhed et mindre pænt billede på grund af den dårlige fixation.

b. Labyrinther afkalkede med 1 n. salpetersyre

Der gælder for de seks fixationsmetoder samme forhold som ovenfor beskrevet, idet der ikke er nogen væsensforskel mellem de salpetersyreafkalkede og myresyreformiatafkalkede præparater. Det vil sige, at marvskedefarvningen præsenterer sig smukt i præparater fixerede med Kaformacet, Kaformisal og Susa, men mindre godt i præparater fixerede med sublimatalkohol, Carnoy's vædske og formalin.

Mitokondriefarvning a. m. Altmann-Kull på labyrinther

a. Myresyreformiatafkalkede præparater.

Kaformacet: Farvningen er meget kraftig og præsenterer de enkelte elementer i det Cortiske organ på udmærket måde. Gangliecellerne står mere udflydende på grund af den ret stærke medfarvning. Ydre sanseceller ses middelstærkt røde med sortrøde kerner, men uden sikkert differentierbare mitokondrier. I den indre sansecelle ses flere steder en mørk granulering (væsentligst langs cellens rande og basalt for kernen), der må antages at være mitokondrier.

Kaformisal: Farvningen er meget intens, men det Cortiske organ præsenterer sig mindre pænt med tendens til udflyden af cellekonturerne. Ydre og indre hårceller viser tendens til granulering i cytoplasmaet, men ikke nær så udtalt som i forrige præparat.

Susa: Intens farvning. Det Cortiske organ tegner sig pænt. Enkelte steder i hårcellerne antydning af granulær tegning, mest basalt for kernen og i de indre hårceller. I de sidste 3 præparater fixerede med sublimatalkohol, Carnoys vædske og formalin kan det på grund af det Cortiske organs tilstand ikke forventes at finde mitokondrier.

b. Labyrinther afkalkede i salpetersyre.

For disse præparater gælder det samme som for ovennævnte præparater, idet der ikke er væsensforskelle i farveintensiteten eller tegning af det Cortiske organ indenfor ensartede fixerede præparater. Mitokondrier ses tydeligt basalt i de indre hårceller i det kaformacetfixerede præparat.

Sølvimprægnation a. m. Saxén på labyrinther

a. Præparater afkalkede i myresyreformiat.

Kaformacet: I hjernevævet ses en ret intens og nydelig imprægnation af aksecylindrene. Det samme gælder nervus cochlearis i hele dennes udstrækning samt de præganglionære tråde. Der er en meget intens sværtning af gangliecellernes organeller, således at cytoplasmaet fremtræder næsten sort mod den helt lyse kerne. Nervetrådene kan følges ud til det sted, hvor de træder ind i den Cortiske tunnel. Farvningen yder ikke noget særligt ved bedømmelsen af de enkelte celler i det Cortiske organ, dog ses der i de basale vindinger i Boetchers celleformationer et par klumper af argyrofile granula.

Kaformisal: Aksecylindrene i hjernevævet står overordentligt skarpt tegnet. Det samme gælder for nervus cochlearis, som dog kun er ramt rent enkelte steder. De præ- og postganglionære tråde står ligeledes pænt, men gangliecellerne mangler næsten sværtning. Iøvrigt er præparatet præget af diffuse udfældninger.

Susa: Imprægnationen af hjernevævet er dårlig og det samme gælder nervus cochlearis og de præganglionære tråde. Der er lidt mere sværtning i gangliecellernes protoplasma end i forrige præparat, men præparatet er ikke særligt anvendeligt.

Sublimatalkohol: Imprægnationen viser diffuse og ret grovkornede sølvudfældninger såvel i hjernevævet som i cochlea, hvor store partier af nervus cochlearis er ufarvet og gangliecellerne fremtræder som negativt billede. Ingen nervetrådsfarvning.

Carnoy: Meget svag imprægnation af såvel hjernevæv som nervøse elementer i cochlea, specielt ses der ingen nervetrådsfarvning.

Formalin: I nervus cochlearis tilløb til trådstrukturtegning, medens gangliecellerne stort set er uimprægnerede.

b. For de *salpetersyreafkalkede* præparaters vedkommende gælder tilsvarende forhold som ovenfor nævnt, dog er sværtningen mindre både i henseende til udbredning og intensitet.

Nyrekontrolforsøg fra gennemskylningen 12. 11. 47

(Farvning med Bøhmers hæmatoxylin, Weigerts hæmatoxylin og Gallocyanin)

α) *Med gallocyanin* findes, at kernefarvningen i tubuli contorti og i glomeruli er den mest intense i sublimat-alkoholfixerede præparater (I og II), dernæst kommer de to formol-præparater og endelig de to carnoy-fixerede præparater.

Kaformacet- og kaformisal-præparaterne er forholdsvis svagt tegnede i kernerne. Susa-præparaterne indtager en mellemstilling mellem de formolfixerede præparater og de to kaliumbikromatfixerede præparater.

β) *Med Bøhmers hæmatoxylin* ses ved sammenligning mellem de to kaformisal-præparater med de to kaformacet-præparater, at glomeruli er ensartede af størrelse og kernerne i disse ensartede. Kernerne i tubuli contorti og samlerør er lidt svagere tegnet i kaformacet-præparaterne. Samtidig med den noget stærkere tegning af kernerne i kaformisal-præparaterne findes en større protoplasmatisk medfarvning. Ved sammenligning med susa-præparaterne ses en protoplasmatisk medfarvning i kaformacet-gruppen, medens kernefarvningen for susa-præparaterne er noget mere distinkt end i begge de foregående. Glomeruli er af samme størrelsesorden og kapselrummet af tilnærmelsesvis samme størrelse. Cellekonturerne står lige godt i susa- og kaformacetpræparaterne, måske lidt udviskede i kaformisal-præparaterne.

I formolpræparaterne er protoplasmamedfarvningen næsten som i kaformisal-præparaterne, men kernetegningen er betydeligt mere distinkt end i de foregående. Imidlertid ses en tydelig skrumpning af samtlige vævselementer med små glomeruli og middelstore kapselrum. Desuden er der ret udtalt opblødning og udviskning af de luminale konturer af tubuli contorti med tab af børstesømmen flere steder.

Carnoy-præparaterne forholder sig på samme måde, udover at der er mindre protoplasmatisk medfarvning.

Sublimat-alkoholfixerede præparater viser ringe medfarvning af protoplasmaet, ret distinkt kernefarvning, omend ikke så kraftig som formol- og Carnoy-præparaterne. Der ses den samme udflyden af de luminale konturer i tubuli contorti, og glomeruli er meget skrumpede med forstørrede kapselrum.

γ) Ved *Weigertfarvningerne* ses kun små afvigelser i den protoplasmatiske medfarvning. Kernefarvningen er mindst distinkt og udtalt i kaformacet-, kaformisal- og susapræparater, i den nævnte rækkefølge. Kernefarvningen er meget mere distinkt i Carnoy-formol og sublimatalkohol-præparaterne, i den nævnte rækkefølge, men til gengæld findes der som i Bøhmer-præparaterne tegn på dårlig fixation i form af udflyden af de luminale cellegrænser i tubuli contorti, opflossen af cellerne og tab af børstesømmen. Endelig er der skrumpning af glomeruli med forstørrelse af kapselrummene, mest udtalt for sublimatalkohol-præparaterne.

LABYRINTH-pH-FORSØG

Opgave: Elektrometrisk måling af brintionkoncentrationen indenfor indre øres benede kapsel under afkalkningen for om muligt at skabe en forklaring på det faktum, at organon *Corti* som oftest præsenterer sig pænt til trods for påvirkning med meget stærke syrer.

Undersøgelsen foretages med 1 normal salpetersyre og myresyreformiatblanding nr. 10. Til forsøgene anvendes ossa temporalia fra tidligere gennemskylningsfixationsrækker. Hovederne gennemsaves på langs i højre og venstre halvdel. Hjernen fjernes under gennemskæring af hjernenerve VII og VIII. Laterale væg i bulla tympanica fjernes forsigtigt tillige med øreknogler (÷ stapes). Ved hjælp af tandlægebor fræses et hul medialt og dybest på den basale vindings kapsel. En udtrukket glasstav, der er lidt tykkere end den glaselektrode, der skal anvendes til målingerne, anbringes in situ i det udfræsede hul ved hjælp af indstillelige klemskruer. Tindingebenet har inden dette fået lov til at tørre i luften et par timer af hensyn til bindingen af paraffinen. Der laves nu en paraffinskorsten med vat som skelet omkring glasstaven, hvorunder det påses, at der ikke kommer paraffin i fenestrene, hvor muligheden for syrediffusion skulle være størst. Når paraffinen er nogenlunde stivnet, fjernes præparatet + indsmeltet glasstav i sammenhæng. Skorstenen køles i rindende vand og glasstaven kan trækkes ud og erstattes med den spidse glaselektrode. På denne måde har man garanti for at måle pH i de endokapsulære rum, forudsat skorstenen slutter tæt, og at det udenforstående syrebad ikke når over skorstenens kant. Imidlertid duede de første paraffinskorstene ikke, idet de ikke sluttede tæt. Det forsøgtes så at føre labyrintherne igennem alkohol til xylol. Herefter lykkedes det at få skorstenene til at slutte tæt, efterprøvet ved at puste og suge i skorstenene. Efter fremstillingen af disse skorstenspræparater blev de opbevaret i tynd formolvand til forsøgene påbegyndtes.

Inden de enkelte forsøg begyndte, blev der foretaget pH-måling af opbevaringsvædsken og af den anvendte syre.

Opstillingen fremgår bedst af det i texten afbildede foto (side 158).

Forud for hver måling gik følgende manipulationer, idet strømmen til pH-apparatet blev afbrudt for hver måling for ikke at slide for meget på batterierne:

1½ min. før åbne for strømmen og åbne for 0–7-områdeknappen.

1 min. før åbne glashanen på kalomelelektroden et øjeblik til fornyelse af den mættede kaliumklorid i spidsen af gummidrænet.

¾ min. før regulere 7-stillingen.

½ min. før trykke pH-knappen ned, da indstillingen ved denne opstilling tager længere tid end sædvanligt. Aflæsning præcist ½ min. senere.

Labyrinth pH-forsøg I (5. 12. 47 kl. 1415). Anvendt 1 n salpetersyre med pH på 0.1 (stikelektroden viser 0.55!). Paraffinskorstenen fyldes op med formolvand (pH = 6.4) ved hjælp af en sprøjte med fin kanyle. Det viser sig, at elektrodespidsen skal være neddyppet mindst 4 mm, men dette skulle også kunne lade sig gøre, da skorstenene alle er mindst 1 cm.

Alligevel bliver målingerne af pH gennemgående 0.4—0.5 for lave

Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH
1420...	5.9	1445...	4.9	1545...	3.7	2000...	1.9	1000...	0.55
1425...	5.5	50...	4.8	1600...	3.5	2200...	1.5	1200...	0.50
1430...	5.3	1500...	4.6	30...	3.0	2400...	1.0	1400...	0.55Afk.
1435...	5.1	15...	4.3	1700...	2.8 (6.12)	0400...	0.8		slut.
1440...	5.0	30...	4.0	1800...	2.5	0800...	0.6		

Efter forsøget er skorstenen fremdeles tæt. Knoglen fuldstændigt blød og bøjelig.

Labyrinth pH-forsøg II (beg. 8. 12. 47 kl. 1800). Anvendt 1 n HNO_3 (pH = 0.1).

Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	
1800...	5.2	1820...	3.3	1850...	2.0	2200...	1.0	1000...	0.8	
05...	4.6	25...	3.0	1900...	1.9	2400...	0.9	1200...	0.7	
10...	4.1	30...	2.7	30...	1.7 (9.12)	0400...	0.9	1400...	0.5	
15...	3.7	40...	2.3	2000...	1.5	0800...	0.8	1800...	0.5	Afk. afsluttet

Efter forsøget fandtes paraffinrøret ikke helt tæt. Det var tæt til at begynde med, idet der som sædvanligt var foretaget en kontrol på rørets anvendelighed ved at blæse og aspirere gennem skorstenen.

Labyrinth pH-forsøg III (10. 12. 47 kl. 1245). Anvendt 1 n HNO_3 (pH = 0.0). pH af fixationsvædsken (tynd vandig formolopløsning) = 6.1.

Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	
1245...	6.1	1310...	4.9	1500...	3.2 (11.12)	0400...	0.8	
50...	5.7	15...	4.7	1700...	2.3	0800...	0.6	
1300...	5.4	30...	4.6	2000...	1.9	1200...	0.6	Afk. slut.
05...	5.2	1400...	4.0	2400...	1.3			

Paraffinrøret holder tæt.

Labyrinth pH-forsøg IV (12. 12. 47 kl. 1945) *og VI* (21. 12. 47)*:* Ved det første forsøg er der anvendt 1 n HNO_3 (pH = 0.1). Spidsen af cochlea er klippet af. I løbet af mindre end 10 minutter faldt pH til 1.8, blev stående ca. ¾ time, men faldt så langsomt i løbet af natten til 1.1 (13.12 kl. 0800) videre til 0.7 (1300) og endelig 0.6 (kl. 1800) ved afkalkningens afslutning.

Ved det andet forsøg er der lavet hul gennem stapesvinduet. Der er anvendt myresyreformiatblanding nr. 10 (pH = 2.2). I løbet af 7 minutter falder pH ned til pH 2.8, hvor den holder sig konstant.

Labyrinth pH-forsøg V (19. 12. 47 kl. 1500). Myresyrebl. X (pH = 2.2).

Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH
1500...	6.3	1530...	4.7	1900...	3.1	1200...	2.8	1300...	2.7
05...	5.9	1600...	4.1	2300...	2.9	2400...	2.8		slut.
15...	5.3	1700...	3.4 (20.12)	0800...	2.8 (21.12)	0800...	2.7		

Labyrinth pH-forsøg VI (22. 12. 47 kl. 0600). Myresyrebl. X (pH = 2.2). Præparatet stået i postevand (pH = 7.2).

Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	Kl.	pH	
0600...	7.2	0645...	5.0	1000...	3.0 (23.12)	0600...	2.8	
05...	6.7	0700...	4.3	1200...	2.9	1800...	2.8	
10...	6.4	30...	3.7	1400...	2.9 (24.12)	0800...	2.75	Afk. slut
20...	6.0	0800...	3.4	1800...	2.9	1200...	2.65	
30...	5.6	0900...	3.2	2200...	2.9	1700...	2.7	

SAMMENDRAG

Hovedformålet med nærværende arbejde var at fremstille en metode til histologisk fremstilling af det indre øre, med mulighed for at farve ganglіecellernes Nissl-substans med den progressivt arbejdende gallocyaninkromalunlak. Under tidligere experimentel-histologiske arbejder var værdien af denne farvemetode til bedømmelse af det indre øres nervøse apparat blevet mig indlysende. Det lykkedes ikke dengang at bringe metoden i anvendelse som følge af præparaternes indlejring i celloidin og som følge af afkalkning med stærk syre.

Det var nødvendigt at foretage en systematisk undersøgelse af forskellige syrers afkalkende effekt sammenlignet med farveresultaterne, væsentligst bedømt ved hjælp af *Einarsons* gallocyaninmetode (1932).

I.

Det kan ikke med sikkerhed fastslås, hvornår man er begyndt at anvende afkalkning systematisk i den histologiske teknik, en følge af udstrakt anvendelse af forskellige syrer som fixativer. Metoden synes at være opstået lidt efter lidt af de ældre macerationsmetoder i begyndelsen af forrige århundrede.

Det er sikkert ingen tilfældighed, at anvendelsen af syrer som afkalkningsmiddel tidligt kom i brug ved den histologiske undersøgelse af det indre øre som følge af dette sanseorgans beliggenhed indkapslet i solid knogle. Ved undersøgelser på dette felt var det ikke som ved knoglehistologi muligt at fremstille slibesnit. Desuden var denne undersøgelsesform meget tidrøvende og kunne slet ikke anvendes til seriefremstilling (*Hopewell-Smith*).

Ved gennemgang af den tilgængelige litteratur er der fundet meget få og lidet omfattende undersøgelser over afkalkning. Det er desuden påfaldende så lidt nyt, der er fremkommet herom i de senere årtier (*Jaffe*). De store håndbøger er med perioder på indtil 43 år mellem første- og sidsteudgaven uændrede i afkalkningsafsnittene, højst med småændringer i typografien.

Vævenes farvbarhed i tilslutning til afkalkning fandtes stedmoderligt behandlet. Med undtagelse af *Lillies* arbejde (1944) er der ikke gjort brug af de kemiske og biokemiske hjælpemidler, fremkommet i de sidste årtier. Specielt kan fremhæves, at der ikke foreligger sammenlignende undersøgelser over afkalkningsevne og indflydelse på farvbarheden hos syrer, hvis koncentration er angivet med kemisk terminologi (normaliteter).

II.

Der gøres rede for tidligere, systematiske undersøgelser over afkalkning, idet også andre forhold af betydning for det endelige resultat gennemgås. På samme måde gennemgås andre undersøgelser af interesse i denne sammenhæng.

Ved de fleste undersøgelser pointeres vigtigheden af god fixation. Hertil er oftest anvendt 4—10% vandige opløsninger af formalin. Ved afkalkning i ørehistologien er der i den ældre litteratur angivet osmiumsyrefixation, medens der i den nyere litteratur overvejende er angivet kaliumbikromatholdige vædsker.

Kravene til fixation formuleret af *Peter Gray* refereres.

I ældre arbejder er der lagt vægt på hærdning i stigende styrker alkohol inden afkalkningen. Dette er praktisk taget forladt. I denne henseende kunne *Hamberger & Hydéns* angivelse (1945) af lanthans fældende virkning overfor nukleinsyrerne i ganglieceller påregne en vis interesse.

En oversigt over de anvendte syrer viser, at disses tal er meget stort med et utal af variationer. Dette kan kun tages til indtægt for metodernes mangelfuldhed. Den mest anvendte syre er salpetersyre i vandige eller alkoholiske opløsninger (2—10%).

Tidspunktet for afkalkningens ophør er af de fleste forfattere undersøgt ved stik eller skæren i præparaterne. Kun få har anvendt de mere skånsomme kemiske metoder, og kun een *(Hagens)* har anvendt røntgenfotografering som rutinemetode. Sidstnævnte metode er nævnt af *Alexander & Fischer* og af *Schmorl.*

Indlejringen har givet anledning til vanskeligheder, som ikke formindskedes ved anvendelse af lever eller hjernemasse som indlejringsmateriale. Teknikken blev meget forbedret ved fremkomsten af celloidin og paraffin, hvor førstnævnte overvejende er blevet anvendt ved indlejring af benede væv.

Ved farvning i tilslutning til afkalkning er det værd at lægge mærke til, at det som helhed kun er lykkedes at fremstille gode præparater ved anvendelse af hæmatoxyliner (især jernhæmatoxylin), hvorimod farvninger af nervevæv som oftest er slået fejl.

III.

Ved egne undersøgelser er der taget hensyn til fixation, afkalkning og efterbehandling samt farveresultater i tilslutning til afkalkning.

Der er ved fixation skelnet mellem den postmortelle metode (den sædvanligt anvendte fixationsform) og den intravitale fixationsmetode. Den postmortelle metode udviste tydelige autolytiske forandringer, mest udtalte i nyrevæv. I modsætning hertil gav den intravitale fixationsmetode fortræffelige resultater i morfologisk og farveteknisk henseende. Det lykkedes ikke at fremstille en enhedsfixation, efter hvilken man kunne fremstille kerner og Nissl-substans lige godt.

Den intravitale fixationsmetode gav bedst resultat efter anvendelse af Susa eller Kaformacet.

Ved afkalkningsundersøgelserne anvendtes som testobjekter indledningsvis 1 cm lange stykker af ribben (homo). Da afkalkningen foregik uensartet, anvendtes (efter indledende forsøg over anvendeligheden af knogleringe af substantia compacta fra hesteforpibe) cirkulære knogleplader af substantia compacta med en tykkelse på 2 mm. en diameter på 7.5 mm og en vægt på 170 mg. Disse knogleplader viste sig ved prøveafkalkning velegnede som testobjekter.

I de indledende ribbensmodelforsøg anvendtes stik og skæren til vurdering af afkalkningens forløb. I hovedforsøgene anvendtes udelukkende røntgenfotografering. Denne fremgangsmåde havde den fordel at sætte een i stand til at udtrykke afkalkningens forløb talmæssigt ved aflæsning af knoglepladernes randafsmalning.

Ved vurdering af afkalkningen anvendtes pH-målinger, bestemmelse af afkalkningstid- og forløb samt farveresultater efter anvendelse af forskellige syrer under forskellige betingelser (brugte og ubrugte syrer, 1, – 2 og 1/10 normale syrer, afkalkning ved 5, 20 og 33° Celsius).

pH-målingerne viste sig at være et godt holdepunkt for syrernes styrke udtrykt ved disses dissociationskonstanter. Ved hjælp af pH-målingerne var man i stand til at indkredse anvendelsesområdet for organiske og uorganiske syrer. Dette viste sig at være størst for de organiske syrer.

De indledende ribbensmodelforsøg viste afkalkningstider, som svarede til de i litteraturen anførte. Forsøgene med knoglepladerne var dog mere eentydige. Det viste sig, at anvendelse af 2 normale syrer ikke frembød nogen fordel fremfor 1 normale syrer. 1/10 normale syrer var enten meget langsomt arbejdende, eller formåede ikke at gennemføre afkalkningen. Det viste sig, at det ikke altid kunne forventes, at syrer af høj koncentration er hurtigere afkalkende end samme syre af lavere koncentration. Forholdet kan muligvis forklares ved nedsat ionaktivitet som følge af den høje ionkoncentration.

Afkalkningens forløb for de forskellige syrer svarede udmærket til syrernes styrke angivet ved disses styrkeexponenter. Forløbet var lineært for alle syrer (stejlt for de stærke syrer og fladt for de svage syrer). Dette forhold viser tydeligt, at brintionkoncentrationen spiller den største rolle ved afkalkningens forløb og dermed for processen i det hele taget.

Ændringer af temperatur gav nok ændringer i afkalkningshastighed, men ikke så meget som forventet. Dette beror på, at vi ved afkalkning af knoglevæv i syre har at gøre med en heterogen proces, hvor berøringsfladerne mellem de to faser er meget små.

Brugte syrer gav ingen forskydninger i afkalkningstid- eller forløb med undtagelse af brugt svovlsyrling, hvor tiden blev væsentligt forlænget. På røntgenbillederne fandtes i de svovlsyrlingsafkalkede knogleplader, og mest ved anvendelse af brugt syre, kridhvide (kontrastrige) udfældninger, som man måtte mistænke for at være gipsudfældninger. Denne mistanke bestyrkes ved særlig udtalt optræden i brugte opløsninger af svovlsyrling. Den bestyrkes yderligere af, at det fra kemien vides, at svovlsyrling på grund af reducerende egenskaber er tilbøjelig til at omdannes til svovlsyre ved optagelse af luftens ilt. Den dannede svovlsyre forbinder sig med allerede opløste kalksalte til uopløselig gips, der udfældes. *Schaffers* iagttagelse af optræden af copiøse udfældninger ved forsøg over knogleaskens opløselighed i svovlsyrling peger i samme retning. Det frarådes efter dette at anvende svovlsyrling til afkalkning.

Anvendelsen af alkoholiske syreopløsninger eller tilsætning af formol eller floroglucin har ingen berettigelse. De bevirker kun en forlængelse af afkalkningstiden. Til aflæsning anvendtes et mikrofilmlæseapparat, hvor røntgenbillederne af knoglepladerne projiceredes på en skala inddelt i 1/10 mm.

Som afkalkende medier anvendtes i de indledende forsøg syrer af sammensætsætning og styrke som angivet i litteraturen. I hovedforsøgene anvendtes udelukkende normale syrer (x gramækvivalenter pr. liter) med den motivering, at afkalkningen i lighed med en kemisk proces finder sted efter støkiometriens love og ikke i empirisk valgte procenter.

Det viste sig, at man med myresyre og dens natriumsalt fik en stødpudeblanding med de ønskede kvalifikationer. Blandingen afkalkede effektivt ved højere pH end de sædvanlige afkalkningsvædsker. Myresyreformiatblanding nr. 10 (lige dele 8 n myresyre og 1 n natriumformiat med pH = 2.2) arbejdede lige så hurtigt som 40 og 20% myresyre (pH 0.4 og 1.1) tiltrods for disses højere pH. Blandingen var yderligere hurtigere end den fra amerikansk side så meget roste myresyre-citratblanding med pH = 1.8.

Afkalkning med anvendelse af elektrolyse havde ingen værdi.

Ved bedømmelse af farveresultaterne lagdes hovedvægten på fotometrisk bestemmelse af farveintensiteten efter farvning af specielt fremstillede kernepræparater med gallocyanin. Disse objektglasmonterede kernepræparater anbragtes tillige med formolfixeret kalverygmarv i de forskellige syrer, indtil knoglepladen var afkalket. Derpå skylledes snittene i vand og farvedes. 1 og 2 normal myresyre gav de bedste resultater. Høj eller lav temperatur gav ingen fordel, idet kernefarvningen beskadigedes. Brugte opløsninger ydede heller ikke fordele. Det samme gjaldt anvendelse af lanthan.

Alle myresyreformiatblandingerne viste gode, ensartede farveresultater, hvorfor den hurtigst afkalkende syreblanding (nr. 10) blev foretrukket.

Sammenlignet med andre syrer under lignende betingelser gav myresyreblandingerne ikke anledning til overafkalkning.

Ganske tilsvarende resultater fandtes ved undersøgelse af Nissl-farvningen på kalverygmarv.

Ved en kombineret farve- og pyknometerundersøgelse viste det sig, at efterbehandling med natrium- eller lithiumsulfat ikke kunne hindre svulst eller skrumpning af vævene, men gav en tydelig nedsættelse af vævenes farvbarhed. En sådan efterbehandling med alkaliske vædsker frarådes derfor, da den blot virker tidrøvende.

IV.

Den historiske oversigt over det indre øres histologi viser klart, hvor store vanskeligheder dette felt har voldt histologerne. Vanskelighederne skyldes det indre øres indkapsling i hård substantia compacta. Man søgte at omgå vanskelighederne ved fremstilling af plukkepræparater i havvand, sukkeropløsninger, jodserum, humor aqueus eller lignende, og der blev i udstrakt grad anvendt embryoner og fostre til undersøgelserne.

Ligesom ved knoglehistologisk afkalkning findes indenfor oto-histologien et utal af afkalkningsmetoder, bevisende metodernes utilstrækkelighed.

Resultaterne af farveforsøg efter afkalkning har ikke været gode. Specielt er det ikke lykkedes at fremstille Nissl-substans i de til det indre øre knyttede ganglier.

V.

Ved egne undersøgelser over labyrinthhistologien er der ved fixationsforsøgene anvendt følgende vædsker: 10% formalin, Kaformacet, Kaformisal, Susa, sublimatalkohol og Carnoy's vædske. Af disse gav Kaformacet overensstemmende med *Werner* (1940) de bedste resultater. Susa var næstbedst. De øvrige fixationsvædsker gav slette resultater med defiguration af det *Cortiske* organ og ganglie-

cellerne. Dette illustreres ved almindelig mikroskopi og ved fasekontrastmikroskopi på ufarvede snit. Resultaterne stemte med fundene i nyrevæv fra de samme dyr, hvorefter nyrerne anbefales som kontrolobjekter ved intravitale fixationer.

Ved røntgenspektrografi søgtes klarlagt, om den benede labyrinthkapsels hårdhed skyldtes tilstedeværelsen af særlige salte, eventuelt en særlig lejring af disse salte. Det var ikke tilfældet, hvorfor labyrinthkapslen er at ligestille med almindeligt benvæv.

Afkalkningstiden afhang af dyrenes alder og fandtes ca. dobbelt så lang for myresyreformiatblanding i forhold til 5% salpetersyre.

Indlejringen måtte af hensyn til gallocyaninfarvningen af Nissl-substansen foregå i paraffin. Følgende fremgangsmåde var bedst: Afvanding i stigende styrker alkohol til absolut alkohol, cedertræsolie 1 døgn, ligroin 1–2 timer, paraffin i 12 timer ved 56° C. Der anvendtes paraffin med smeltepunkt ved 54° C., iblandet ca. 20% gul bivox for at bevare smidigheden under den for seriesnitfremstillingen nødvendige nedkøling til 4–5° C. Det lykkedes på denne måde at fremstille snit på 6–7 mikron.

Ved farveundersøgelserne fandtes Nissl-substansen fortræffeligt farvet og tegnet i de myresyreformiatafkalkede præparater, medens der ikke var antydning af Nissl-substans i de salpetersyreafkalkede præparater. Også ved andre farvemetoder viste det sig at være en fordel at anvende myresyreformiatblandingen selv om metoden tager noget længere tid i anvendelse end den gængse 5% salpetersyre.

Ved nogle afsluttende labyrinth-pH-målinger under afkalkningen lykkedes det ved hjælp af en særlig teknik at finde en sandsynlig forklaring på, at organon *Corti* bevares så godt tiltrods for påvirkning med stærke syrer. pH-kurvernes forløb sandsynliggjorde, at langsom inddiffusion af syrerne i forbindelse med høj koncentration af kalksalte indenfor labyrinthkapslen forhalede optræden af vævsbeskadigende pH-værdier (under 1) i den hindede labyrinth.

pH målinger

og tavler over røntgenforsøg

I—XIV

Tavle over

Bestemmelse af pH og millivoltspænding ved *ufuldstændig afkalkning* »trætning kl. 0930. (Til forsøgene anvendt 20 cc.

Dato	24.6.								
Klokkeslet	0930	1030	1130	1230	1330	1430	1530	1630	1815
HNO_3	÷	0.0	0.15	0.4	0.5	0.7	0.9	1.1	1.15
	380	370	360	345	340	330	310	305	300
HCl	÷	0.05	0.25	0.5	0.65	0.85	1.1	1.2	1.3
	380	365	355	340	330	320	305	300	295
H_2SO_4	0.05	0.05	0.1						
	365	365	365						
H_2SO_3	0.85	1.4	1.65	1.9	2.2	2.4	2.5	2.7	2.85
	320	290	275	260	240	225	220	210	205
H_3PO_4	0.9	1.55	1.75	1.95	2.1	2.05	2.3	2.4	2.45
	320	280	270	255	250	225	235	230	225
H_2CrO_4	0.5	0.9	1.3	1.55	1.7	1.95	2.15	2.3	2.35
	340	320	295	280	270	255	240	235	230
HCOOH	1.6	2.4	2.5	2.7	2.7	2.8	2.9	2.9	3.05
	270	230	220	210	210	210	200	195	185
CH_3COOH	2.2	2.9	3.0	3.2	3.3	3.4	3.45	3.45	3.5
	240	200	195	185	180	180	170	170	170
CCl_3COOH	0.1	0.25	0.4	0.55	0.7	0.9	1.1	1.2	1.3
	365	355	345	340	330	320	310	300	290
$C_2H_4OHCOOH$	1.5	2.2	2.4	2.55	2.65	2.7	2.8	2.8	2.85
	280	240	230	220	215	210	210	210	205
$C_6H_8O_7,H_2O$	1.5	2.05	2.2	2.35	2.4	2.55	2.55	2.7	2.8
	280	250	240	230	230	220	220	215	205

(Målt på Medicinsk-anatomisk Instituts autojonometer). *Konklusion:* Uorganiske syrer

pH-forforsøg I

af syrer« med forskellige 1 normale syrer ved stuetemperatur. Påbegyndt 24. 6. 47
1 normal syre + 2 knoglepladeringe).

25.6.			26.6.	27.6.	28.6.	30.6.	
0015	0915	1930	0930	0930	0930	0930	
1.5	2.4	2.25	2.35	2.5	2.5	2.4	+++ salt smag
285	255	245	230	225	225	230	
1.6	2.3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.4	+++ – –
280	240	230	225	225	225	230	
			0.0				+++ sur –
			370				
3.2	3.7	3.9	3.8				++ salt –
185	160	150	150				
2.75	3.2	3.15	2.9			3.05	(+) – –
210	190	195	200			195	
2.65	3.05	3.15	3.2	3.5	3.7	3.95	++ – –
215	200	195	185	170	160	140	+ metal smag
3.3	3.5	3.4	3.5			3.55	+++ salt smag
175	180	170				165	
3.55	3.8	3.9	3.9			3.95	+(+) – –
165	160	150	150			145	
1.65	2.1	2.35	2.4	2.65	2.7	2.55	++ – –
275	250	235	235	215	215	220	(+) sur –
2.9	3.25	3.4	3.35			3.55	++ salt –
200	190	180	180			170	
2.85	3.15	3.15	2.9			3.0	+(+) – –
205	195	195	205			20 0	

+ trikloreddikesyren afkalker til pH 2.4, organiske syrer til pH 3 — 4, svovlsyre slet ikke.

Tavle over

Bestemmelse af pH og millivoltspænding under afkalkning med I: n/10 salpeter-
170 mg med et Ca^{++}-indhold på ca. 50 mg) og med II: de samme syrer i den
samme syrer (1 normale, 10 cc.).

Dato	24.6.								
Klokkeslet	0930	1030	1130	1230	1330	1430	1530	1630	1815
I: (1/10 normale)									
HNO_3, 10 cc	0.5	0.6	0.65	0.7	0.95	0.95	0.9	1.0	0.85
	340	335	330	330	315	315	315	310	320
HCOOH, 10 cc	2.0	2.25	2.3	2.5	2.5	2.65	2.6	2.7	2.8
	250	235	235	225	220	215	215	210	210
II: (1/10 normale)									
HNO_3, 100 cc				0.8	0.8	0.85	0.85	0.85	0.75
				325	325	325	325	320	325
HCOOH, 100 cc				2.2	2.1	2.2	2.2	2.1	2.15
				250	250	240	240	250	245
III: (1 normale)									
HNO_3, 10 cc									
HCOOH, 10 cc									

(Målt med Medicinsk-anatomisk

pH-forforsøg II

syre og myresyre i støkiometrisk forhold (ca. 10 cc. syre til 1 knogleplade a ca. 10-dobbelte mængde (100 cc.). Påbegyndt 24. 6. 47 kl. 0930. III: Afkalkning med Påbegyndt 26. 6. 47 kl. 1130.

25.6.			26.6.	27.6.	28.6.	30.6.	1.7.	
0015	0915	1930	0930	0930	0930	0930	0930	
0.9	1.3	1.3	1.5	1.3				+ afkalkning
310	300	300	285	295				
3.1	3.25	3.25	3.3	3.5	3.6	3.7	3.7	÷ afkalkning
195	185	185	180	170	160	160	160	
0.8	1.05	1.0	0.85					+ afkalkning
325	315	320	325					
2.2	2.4	2.55	2.5	2.6	2.6	2.7		+ afkalkning
240	230	225	225	220	220	215		
			÷	÷				+ afkalkning
			380	380				
			1.55	2.35	2.5			+ afkalkning
			280	230	225			

Instituts autojonometer).

pH-

Måling af millivolt og pH på autojonometer (røntgenforsøg no. I — 2

Dato	11.7.								
Klokkeslet	1030	1200	1300	1400	1500	1600	1800	2000	2200
HNO_3	385	375	385	385	385	385	385		
	÷0.2	÷0.1	÷0.2	÷0.2	÷0.2	÷0.2	÷0.2		
HCl	385	375	385	385	385	385	385		
	÷0.2	÷0.1	÷0.2	÷0.2	÷0.2	÷0.2	÷0.2		
H_2SO_3	315	310	315	315	315	315	310	310	310
	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1
H_3PO_4	315	310	310	310	310	310	310	310	310
	1.0	1.1	1.1	1.05	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
H_2CrO_4	350	345	345	345	345	350	345	345	345
	0.45	0.45	0.4	0.45	0.45	0.4	0.4	0.45	0.45
HCOOH	280	275	280	275	275	275	275	275	270
	1.6	1.7	1.6	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.75
CH_3COOH	250	245	245	240	240	240	240	235	235
	2.2	2.2	2.2	2.25	2.25	2.25	2.3	2.3	2.35
CCl_3COOH	365	360	360	360	365	365	365	365	360
	0.1	0.2	0.2	0.2	0.15	0.15	0.15	0.15	0.2
$C_2H_4OHCOOH$	280	280	275	275	275	275	275	275	275
	1.6	1.6	1.65	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
$C_6H_8O_7,H_2O$	290	285	285	280	280	280	280	280	280
	1.5	1.55	1.55	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

Eddikesyre og citronsyre er undersøgt henholdsvis 3 og 2 gange yderligere,

tabel I

normale syrer ved stuetemperatur (19° C.)). Påbegyndt 11. 7. 47 kl. 1030.

12.7.					14.7.			15.7.			16.7.
0800	1200	1500	1600	1800	0800	1200	1800	0800	1100	1800	0800
310											
1.1											
310	310	310	310								
1.1	1.1	1.1	1.1								
345											
0.45											
270	270	270	270								
1.8	1.8	1.8	1.8								
230	230	225		225	225	225	225	225	225	225	225
2.4	2.4	2.5		2.5	2.55	2.5	2.5	2.55	2.55	2.55	2.55
360	360	360		360	360	365	360	365	365		
0.2	0.2	0.2		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		
270	270	270		270	270	270	270				
1.8	1.8	1.8		1.8	1.8	1.8	1.8				
270	275	275		275	280	280	280	280	280	285	285
1.65	1.65	1.7		1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.65	1.65

men med samme fund som i sidste kolonne.

pH-

Måling af millivoltspænding og pH med autojonometer under
Påbegyndt 15. 7. 47 kl. 1100.

Dato	15.7.						
Klokkeslet	1100	1200	1300	1400	1600	1800	2200
HNO_3	370	370	370	370	370	370	
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
HCl	370	365	370	370	370	370	
	0.1	0.15	0.1	0.1	0.1	0.1	
H_2SO_3	310	305	305	305	305	305	300
	1.15	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.3
H_3PO_4	305	305	300	300	300	300	300
	1.25	1.25	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
H_2CrO_4	335	335	335	335	335	335	335
	0.65	0.7	0.7	0.7	0.65	0.7	0.7
HCOOH	270	270	270	270	265	265	260
	1.8	1.8	1.9	1.85	1.9	1.9	1.95
CH_3COOH	235	235	230	230	230	230	230
	2.35	2.35	2.45	2.4	2.45	2.45	2.45
CCl_3COOH	355	355	350	355	355	355	355
	0.4	0.4	0.4	0.35	0.35	0.35	0.35
$C_2H_4OHCOOH$	270	270	265	270	270	265	260
	1.8	1.85	1.9	1.85	1.85	1.9	1.95
$C_6H_8O_7,H_2O$	275	275	270	275	275	275	270
	1.75	1.75	1.8	1.75	1.75	1.75	1.85

tabel II

afkalkning med 1 normale syrer (sv. t. røntgenforsøg no. II).
Stuetemperatur + 20° C.

16.7.			17.7.			18.7.	19.7.	21.7.	22.7.	
0800	1200	1800	0800	1200	1800	0800	0800	0800	0800	
300	300	300								
1.3	1.3	1.3								
300	300	300		300	300					
1.3	1.3	1.3		1.3	1.3					
335										
0.7										
260	260	260		255						
1.95	2.0	2.0		2.05						
225	220	220	215	210	210	210	205			glasset væltet,
2.5	2.6	2.65	2.7	2.75	2.8	2.85	2.9			forsøget afbr.
355										
0.35										
260	260	260	260	255	255					
1.95	1.95	2.0	2.05	2.05	2.05					
270	270	270	270	270	265	265	260	260		
1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.9	1.9	2.0	2.0		

pH-

Måling af millivoltspænding og pH med autojonometer under afkalkning med
(Svarer til røntgen-

Dato	24.7.							25.7	
Klokkeslet	0800	1000	1200	1400	1600	1800	2200	0800	1200
HNO_3	390	385	390	385	385				
	÷	÷	÷	÷	÷				
HCl	390	385	390	390	385				
	÷	÷	÷	÷	÷				
H_2SO_3	310	305	310	300	305	300	300	300	300
	1.1	1.15	1.1	1.2	1.15	1.2	1.2	1.25	1.25
H_3PO_4	315	315	315	310	310	310	305	305	
	1.05	1.05	1.05	1.1	1.05	1.05	1.15	1.15	
H_2CrO_4	350	350	350	345	345	345	340		
	0.4	0.45	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5		
HCOOH	275	270	270	270	270	270	270	265	
	1.75	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.9	
CH_3COOH	220	215	215	215	215	210	210	210	210
	2.65	2.75	2.65	2.7	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8
CCl_3COOH	365	360	370	370	370	370	370	370	370
	0.15	0.2	0.1	0.1	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1
$C_2H_4OHCOOH$	270	260	270	265	265	265	260	260	265
	1.8	1.9	1.8	1.85	1.85	1.85	1.9	1.9	1.9
$C_6H_8O_7,H_2O$	280	270	280	275	275	275	275	275	275
	1.65	1.8	1.6	1.65	1.65	1.7	1.7	1.7	1.75

tabel IV

brugte, 2 normale syrer ved stuetemperatur (22° C.). Påbegyndt 24. 7. 47 kl. 0800. forsøg no. IV).

25.7		26.7.		27.7.	28.7.		29.7.			30.7.
1700	2200	0800	1800	1200	1600	2200	0800	1200	1500	1200
300	300									
1.3	1.3									
210	205	205	200	200	200	205	205	200	205	205
2.8	2.9	2.9	2.95	2.95	2.9	2.85	2.9	2.85	2.85	2.85
370	370	370	365	365						
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1						
265	265	265								
1.9	1.9	1.9								
275	275	275	275	275	275	275	270	270		
1.7	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75		

pH-

Måling af millivoltspænding og pH med autojonometer under afkalk-
(Svarer til røntgenforsøg no. V).

Dato	28.7.							29.7	
Klokkeslet	0800	1000	1200	1400	1600	1800	2200	0800	1000
HNO_3	370	370	370	370					
	0.05	0.1	0.1	0.1					
HCl	370	370	370	370					
	0.05	0.1	0.1	0.1					
H_2SO_3	295	295	290	290	290	290	285	280	280
	1.35	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.6	1.6
H_3PO_4	300	300	300	300	300	300	295	290	290.
	1.3	1.3	1.35	1.35	1.35	1.35	1.4	1.4	1.4
H_2CrO_4	335	335	330	330	330	330	330	330	330
	0.65	0.7	0.7	0.7	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
HCOOH	260	255	255	250	250	250	250	245	
	2.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.15	2.2	
CH_3COOH	235	230	230	225	225	225	220	215	
	2.4	2.45	2.5	2.55	2.55	2.55	2.6	2.7	
CCl_3COOH	355	355	355	355	355	355	355	355	355
	0.35	0.35	0.3	0.35	0.3	0.3	0.35	0.3	0.3
$C_2H_4OHCOOH$	260	255	255	250	250	250	250	245	
	2.05	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.15	2.2	
$C_6H_8O_7,H_2O$	265	260	260	260	260	260	260	255	
	1.95	2.0	1.95	2.0	2.0	2.0	2.0	2.05	

Eddikesyre først afsluttet den 7.8., men millivoltspænding

tabel V

ningsforsøg med brugte 1 normale syrer ved stuetemperatur (23° C).
Påbegyndt 24. 7. 47 kl. 0800.

29.7.			30.7.			31.7.		1.8.	2.8.	3.8.	4.8.
1200	1500	1800	0800	1200	1800	0800	1200	0800	0800	0800	0800
275	270	270	270	270	270	270	270				
1.65	1.65	1.7	1.75	1.7	1.8	1.8	1.8				
290	290	290	290								
1.4	1.4	1.45	1.4								
240	240	245									
2.2	2.2	2.45									
210	210	210	210	210	205	205	205	205	205	205	200
2.7	2.7	2.8	2.8	2.8	2.8	2.9	2.9	2.9	2.9	3.0	3.0
245	240	245	240	240	240						
2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2						
255	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
2.05	2.05	2.05	2.05	2.05	2.05	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.15

og pH er de samme som i sidste kolonne (4.8.).

pH-

Måling af millivoltspænding og pH under afkalkningsforsøg med forskellige myre-
forsøg no. IX).

Dato	25.8.		26.8.		27.8.		28.8.	29.8.	30.8.	1.9.
Klokkeslet	0800	1800	0800	1800	0800	1800	1200	1200	1200	1200
HCOOH	290	290	285	285						
10 %	1.45	1.5	1.55	1.6						
HCOOH	310	310	310	310						
20 %	1.1	1.15	1.15	1.1						
HCOOH	350	350	350	350						
40 %	0.4	0.4	0.4	0.4						
HCOOH	Millivoltspændingen ikke målelig (over 400 millivolt)									
85 %	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
HCOOH-	270	270	275	280	280					
citrat	1.75	1.7	1.7	1.65	1.65					

Myresyrealkohol- og salpetersyrealkoholforsøgene afbrydes
Læg mærke til den lange afkalkningstid

pH-

Måling af millivoltspænding og pH under afkalkningsforsøg med 1/10
Påbegyndt den

Dato	1.9.				2.9.		3.9
Klokkeslet	0800	1200	1600	2200	0800	1800	0800
HNO_3	320	320	310	310	310		
	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0		
HCl	320	320	310	310	310		
	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0		
H_2SO_3	280	280	270	270	265	265	250
	1.6	1.6	1.7	1.7	1.75	1.8	1.8
H_3PO_4	280	275	265	265	260	265	260
	1.65	1.7	1.75	1.75	1.8	1.8	1.8
H_2CrO_4	305	300	290	290	290	290	285
	1.2	1.2	1.3	1.3	1.25	1.3	1.35
HCOOH	250	240	230	230	220	225	215
	2.2	2.25	2.3	2.35	2.4	2.5	2.6
CH_3COOH	215	210	200	195	190	185	180
	2.7	2.8	2.9	3.0	3.1	3.15	3.25
CCl_3COOH	320	320	315	310	310	310	
	0.9	0.9	0.95	1.05	1.1	1.1	
$C_2H_4OHCOOH$	250	240	230	230	230	225	220
	2.2	2.25	2.3	2.4	2.35	2.5	2.5
$C_6H_8O_7H_2O$	250	240	235	235	230	230	230
	2.15	2.2	2.2	2.3	2.3	2.3	2.35

Eddikesyre- og citronsyreforsøget afbrydes 12.9. kl. 0800, da der ikke

tabel IX

og salpetersyreblandinger ved stuetemperatur (23–22° C.). (Svarer til røntgen-
Påbegyndt den 25. august 1947.

Dato	25.8.		26.8.		27.8.		28.8.	29.8.	30.8.	1.9.
Klokkeslet	0800	1800	0800	1800	0800	1800	1200	1200	1200	1200
HCOOH-	210	210	210	210	210					
formiat	2.8	2.9	2.9	2.9	2.85					
HCOOH-	340	335	330	330	330	330	330	330	330	330
alkohol	0.6	0.7	0.7	0.75	0.75	0.75	0.75	0.7	0.75	0.75
HNO_3-	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
alkohol	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
HNO_3-	375	375								
formol	0.0	0.0								
HNO_3-	380	380								
floroglucin.	÷	÷								

1.9., da der ikke finder nogen afkalkning sted af betydning.
for den concentrerede myresyre.

tabel X

normale syrer ved stuetemperatur (20° C.). (Svarer til røntgenforsøg no. X).
1. 9. 47 kl. 0800.

3.9	4.9.	5.9.	6.9.	7.9.	8.9.	9.9.	10.9.	11.9.	12.9.
1800	0800	0800	0800	0800	0800	0800	0800	0800	0800
260	255	250	245	240	230				
1.85	1.95	2.0	2.1	2.15	2.2				
265	265	260	255	250	250	250	260		
1.85	1.85	1.9	1.95	2.0	2.0	2.0	2.0		
290									
1.4									
220	220	215	210						
2.6	2.5	2.6	2.7						
180	180	175	170	165	160	165	165	165	165
3.3	3.3	3.4	3.45	3.5	3.5	3.5	3.55	3.55	3.55
220	220	220	210	210	210				
2.5	2.5	2.6	2.7	2.7	2.7				
230	230	225	220	215	215	220	220	220	220
2.4	2.4	2.5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.7	2.65

længere finder afkalkning sted og da pH nu holder sig konstant.

Røntgenforsøg

Bestemmelse af forløbet og afslutningen af afkalkningen med 2 normale syrer ved Forsøget påbegyndt

Dato	11.7.								12.7.				14.7.			15.7.
Klokkeslet	12	13	14	15	16	18	20	22	8	12	15	18	8	12	18	8
Tid (timer, døgn)	1½	2¼	3	3¾	4½	6¼	8	9¾	19½	23¼	26	28¾		32½	38¼	52
HNO_3	4	6	8	11^{u}	P	A										
HCl	4	6	8	10^{u}	P	A										
H_2SO_3	1½	3	4	4½	5	5½	6½	7½^{k}	A^{k}							
H_3PO_4	1½	3	4	4	4	4½	5	6½	9	P	L	A				
H_2CrO_4 *)	2	4	5	6	6½	8	10	P	A							
HCOOH	½	1	2	3	3½	4	5	5½	9½	12^{u}	P	A				
CH_3COOH	0	0	0	0	(½)	½	½	1	2	2	2½	3	3½	3½	4	5
CCl_3COOH	2	2½	3	4	5	6	6½	8	10	11^{u}	12	15	15	15	P	L
$C_2H_4OHCOOH$	0	1	1½	2	2	2½	2½	3	5	5½	6	6½	7	7	10^{uh}	A
$C_6H_8O_7,H_2O$	0	0	1	1½	1½	2	2	2½	4	5	5½	6	6	6	6½	8

*) Rygmarvspræparat faldet af under afkalkningen. Skiftning, fotografering

Røntgenforsøg

Bestemmelse af forløbet og afslutningen af afkalkning med for afsmalningen som under I.

Dato	15.7.								16.7.					17.7.	
Klokkeslet	12	13	14	15	16	18	20	22	8	12	15	18	22	8	12
Tid (timer, min.)	1	150	240	330	420	610	8	950	1940	2330	2620	2910	33	4250	4640
HNO_3	4	6	7	9	10	A									
HCl	4	6	7	9	10	A									
H_2SO_3	2	2½	3	3½	4	5	6	6½^{k}	9^{k}	11^{uk}	P^{k}	A^{k}			
H_3PO_4	1½	1½	2	2½	3	4	4½	5	7	8	9	10^{uh}	11^{u}	12^{u}	13^{u}
H_2CrO_4 *)	2½	4	4½	5	6	7	8	10	A						
HCOOH	1	1½	2	2½	3	3	3½	4½	7	8	9½	10^{u}	12^{u}	13	A
CH_3COOH	0	0	0	0	0	(½)	½	1	1½	2	2	3	3	4	4½
CCl_3COOH °)	3	3½	4	5	5½	6	8	10	A						
$C_2H_4OHCOOH$	0	0	0	1	1½	2	2½	3	4½	5	6	6½	8	9½	10½
$C_6H_8O_7,H_2O$	0	0	0	1	1½	1½	1½	2	3½	4½	5	5	5½	6	6

*) Rygmarvspræparat faldet af ved skylning.

no. I

stuetemperatur (19° C.). Nedenstående værdier for afkalkningen er 1/10 mm. 11. 7. 47 kl. 1030.

16.7.	17.7.		18.7.	19.7.	21.7.	Afkalknings-slutpunkt.	Afbrydelser (dato og klokkeslet)	Ti-mer	Afkalkningstid (timer el. døgn)
18	8	18	8	8	8				
$3\frac{1}{2}$	4	$4\frac{1}{2}$	5	6	8				
						11.7. – 18^{00}			$6\frac{1}{4}$
						11.7. – 18^{00}			$6\frac{1}{4}$
						12.7. – 8^{00}			$19\frac{1}{2}$
						12.7. – 16^{00}	12.7. – 16^{00}—18^{00}	2	$26\frac{3}{4}$
						11.7. – 24^{00}			$11\frac{1}{2}$
						12.7. – 16^{00}	12.7. – 16^{00}—18^{00}	2	$26\frac{3}{4}$
5	6	7	10^{uh}	P	A	21.7. – 8^{00}	12.7. – 18^{00}— 14.7. – 8^{00}	38	8 døgn
A						16.7. – 18^{00}	12.7. – 18^{00}— 14.7. – 8^{00}	38	$3\frac{1}{2}$ –
						15.7. – 8^{00}	12.7. – 18^{00}— 14.7. – 8^{00}	38	52 timer
8	10^{uh}	12^{u}	P	A		19.7. – 8^{00}	12.7. – 18^{00}— 14.7. – 8^{00}	38	6 døgn

og pH-måling tager i dette forsøg $\frac{1}{4}$ time, i de øvrige kun 10 minutter.

no. II

1 normale syrer ved stuetemperatur (19–20° C.). Værdier
(Forsøget påbegyndt 15. 7. 47 kl. 1100).

17.7.		18.7.	19.7.	21.7.	22.7.	Afkalknings-slutpunkt	Afbrydelser (dato og klokkeslet)	Ti-mer	Afkalkningstid (timer el. døgn)
15	18	8	8	8	8				
4930	5220	6610	$3\frac{1}{2}$	$5\frac{1}{2}$	$6\frac{1}{2}$				
						15.7. – 18^{00}			6.10
						15.7. – 18^{00}			6.10
						16.7. – 18^{00}			29.10
P	A					17.7. – 18^{00}	16.7. – 22^{00}— 17.7. – 8^{00}	10	42.30
						16.7. – 7^{00}			19.40
						17.7. – 12^{00}	16.7. – 22^{00}— 17.7. – 8^{00}	10	36.50
5	5	6	(Glasset væltet)						
						16.7. – 7^{00}			19.40
P	A					17.7. – 18^{00}			52.20
$6\frac{1}{2}$	7	8	$9\frac{1}{2}$	P	A	22.7. – 8^{00}			$6\frac{1}{2}$ døgn

°) Antageligt noget tidligere færdige (før 0700).

Røntgenforsøg

Bestemmelse af forløbet og afkalkningens slutpunkt ved afkalkning for afsmalningen af knoglepladerne som under I.

Dato	24.7.						25.7.			
Klokkeslet	10	12	14	16	18	22	8	12	17	22
Tid (timer, min.)	2	350	540	730	920	1310	23	2650	3140	3630
HNO_3	6½	12[1]	A							
HCl	6½	13	A							
H_2SO_3	2	4	5	5½[k]	6[k]	7[k]	9[k]	11[k]	12[k]	A[k]
H_3PO_4	2	4	5	5½	7	8	P	A		
H_2CrO_4	4	6	7	10	11[2]	A				
HCOOH	1½	3	4	5	6	7½	P	A		
CH_3COOH	0	½	½	1	1	1½	2	3	4	4
CCl_3COOH	2	3	5	5	5½	7	8	9	10	11
$C_2H_4OHCOOH$	½	2	2½	3	4	4	6	8	9	10½
$C_6H_8O_7,H_2O$	½	1½	2	2½	2½	3	5	5½	6	6½

1) Allerede gulfarvet knoglevæv. 2) Kromsyre-rygmarv faldet af.

Røntgenforsøg

Bestemmelse af afkalkningens slutpunkt ved anvendelse af brugte 1 af knoglepladerne røntgenologisk som under I.

Dato	28.7.						29.7.				
Klokkeslet	10	12	14	16	18	22	8	10	12	15	18
Tid (timer, min.)	2	350	540	730	920	1310	23	2450	2640	2930	3220
HNO_3	6	9	P	A							
HCl	6	9	P	A							
H_2SO_3	1	2	3	3½	3½	4[k]	5[k]	5½[k]	6[k]	7[k]	7½[k]
H_3PO_4	1	2	3	3½	3½	4½	5½	7	8	8	9
H_2CrO_4	2	4	5½	7	8	11	12	A			
HCOOH	1	2	2½	3	3½	5	7	8	9	9	11
CH_3COOH *)	0	1	1	1	1½	2	2	2	2½	2½	3
CCl_3COOH	3	4	5½	7	8	12	P	A			
$C_2H_4OHCOOH$	0	1	1½	2	3	4	5	6	6	6	7
$C_6H_8O_7,H_2O$	0	1	1½	2	2½	3½	4	4½	4½	4½	5

*) Begyndelses-pH lidt for høj (da glasset væltede i foregående forsøg måtte en ny

no. IV

med brugte 2 normale syrer ved stuetemperatur (22° C.). Værdier (Forsøget påbegyndt 24. 7. 47 kl. 0800).

26.7.		27.7.	28.7.		29.7.			30.7.	Afkalknings-slutpunkt	Afkalkningstid
8	18	12	16	22	8	12	15	12		
4620	5610	74	10150	10740	11730	12120	12410	145		
(NB. Temperatur 3° højere end i forsøg I)									24.7. – 14⁰⁰	5.40
									24.7. – 14⁰⁰	5.40
									25.7. – 23⁰⁰	36.30
									25.7. – 10⁰⁰	24.50
									24.7. – 22⁰⁰	13.10
									25.7. – 10⁰⁰	24.50
5	5	5½	7	7	8	8	8	9	1 uge	1 uge
13	14	A[3]							27.7. – 12⁰⁰	74.00
P	A								26.7. – 10⁰⁰	48.10
8	9	11	12[4]	P	L	A			29.7. – 12⁰⁰	121.20

3) Ved skylning falder rygmarv af. 4) Slimede udfældninger.

no. V

normale syrer ved stuetemperatur (23° C.). Værdier for afsmalningen Forsøget påbegyndt 28. 7. 47 kl. 0800.

30.7.			31.7.		1.8.	2.8.	4.8.	6.8.	7.8.	Afkalknings-slutpunkt	Afkalkningstid
8	12	18	8	12	12	12	12	12	12		
4610	50	5550	6940	7330	9720	5 d	7	9	10 døgn		
										28.7. – 15⁰⁰	6.30
										28.7. – 15⁰⁰	6.30
9[k]	10[k]	11[k]	P[k]	A[k]						31.7. – 12⁰⁰	73.30
P	A									30.7. – 10⁰⁰	48.00
										29.7. – 10⁰⁰	24.50
A										29.7. – 22⁰⁰	36.20
3½	4	4½	5	5	6	7	10	P	A	7.8. – 8⁰⁰	10 døgn
										29.7. – 10⁰⁰	24.50
8	10	P	A							30.7. – 22⁰⁰	57.50
5½	6	9	10	10	11	12	A			4.8. – 12⁰⁰	7 døgn

vædske fremstilles ved at lade en knogleplade stå i 1 n CH_3COOH i 1 uge (ikke nok).

Røntgenforsøg

Bestemmelse af afkalkningens forløb og slutpunkt ved anvendelse
bestemmelse af overafkalkningens indflydelse på den

Dato	13.8.		14.8.					15.8.		16.8.	
Klokkeslet	13	20	8	12	16	18	22	8	18	8	18
Tid (timer, min.)	5	1150	2340	2730	3120	3310	37	4650	5640	7030	8020
			1150	1540	1930	2120	2510 (gælder for H_2SO_3, H_3PO_4				
HNO_3	A										
HCl	A										
H_2SO_3	5^k	11^k	12^k	A^k							
H_3PO_4	$4\frac{1}{2}$	$7\frac{1}{2}$	$7\frac{1}{2}$	10	11	P	A				
H_2CrO_4	$7\frac{1}{2}$	A									
HCOOH	3	6	6	8	10	13	A				
CH_3COOH	$\frac{1}{2}$	1	2	3	4	4	4	$4\frac{1}{2}$	$5\frac{1}{2}$	6	7
CCl_3COOH	$3\frac{1}{2}$	6	8	$8\frac{1}{2}$	10	11	11	11	P	L	A
$C_2H_4OHCOOH$	2	$3\frac{1}{2}$	$5\frac{1}{2}$	$6\frac{1}{2}$	7	$7\frac{1}{2}$	8	9	A		
$C_6H_8O_7,H_2O$	$1\frac{1}{2}$	3	4	5	$5\frac{1}{2}$	$5\frac{1}{2}$	6	$6\frac{1}{2}$	$7\frac{1}{2}$	9	$10\frac{1}{2}$

Kromsyrerygmarvspræparat som tidligere faldet af, stærkt skrumpet.
NB. Alle tider kortere end i forsøg I, men

Røntgenforsøg

Bestemmelse af afkalkningens forløb og slutpunkt ved anvendelse af 1 normale
ningens indflydelse på den fotometrisk bestemte

Dato	18.8.			19.8.				20.8.	
Klokkeslet	12	18	22	8	12	15	18	8	18
Tid (timer, min.)	4	950	1340	2330	2720	3010	33	4650	5640
HNO_3	13	A							
HCl	15	A							
H_2SO_3	$3\frac{1}{2}$	5^k	7^k	10^k	P^k	A^k			
H_3PO_4	3	5	$7\frac{1}{2}$	11	P	A			
H_2CrO_4	5	9	10	A					
HCOOH	2	4	5	8	9	P	L	A	
CH_3COOH	0	$\frac{1}{2}$	1	2	$2\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	3	4	4
CCl_3COOH	5	9	P	A					
$C_2H_4OHCOOH$	$1\frac{1}{2}$	3	4	5	6	7	8	11	A
$C_6H_8O_7,H_2O$	1	2	$2\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$	4	5	5	$5\frac{1}{2}$	6

Kernepræparater i citronsyre ødelagt. 18.8 glemt

no. VII

af 2 normale syrer ved stuetemperatur (23–24° C.) under samtidig fotometrisk bestemte kernefarvning. Påbegyndt 13. 8. 47 kl. 0800.

18.8.	19.8.	20.8.		Afkalknings-slutpunkt	Afbrydelser (dato og klokkeslet	Ti-mer	Afkalkningstid (timer el. døgn)
8	8	8	18				
5d	6	7	7½ døgn				
og HCOOH)							
				13.8. – 13⁰⁰			5
				13.8. – 13⁰⁰			5
				14.8. – 10⁰⁰	13.8. – 20⁰⁰— 14.8. – 8⁰⁰	12	13.30
				14.8. – 20⁰⁰	13.8. – 20⁰⁰— 14.8. – 8⁰⁰	12	23.10
				13.8. – 19⁰⁰			10.50
				14.8. – 21⁰⁰	13.8. – 20⁰⁰— 14.8. – 8⁰⁰	12	24.10
10	12	P	A	20.8. – 18⁰⁰			7½ døgn
				16.8. – 10⁰⁰			72.20
				15.8. – 18⁰⁰	14.8. – 22⁰⁰— 15.8. – 8⁰⁰	10	47.10
12	P	A		20.8. – 8⁰⁰			7 døgn

I citronsyre som sædvanlig slimede udfældninger (rygmarv faldet af). præparaterne er heller ikke afbrudt i vand så ofte.

no. VIII

syrer ved stuetemperatur (22–23° C.) under samtidig bestemmelse af overafkalk-kernefarvning. Påbegyndt 18. 8. 47 kl. 0800.

21.8.	22.8.	23.8.	25.8.	27.8.	Afkalknings-slutpunkt	Afkalkningstid (timer el. døgn)
8	8	8	13	10		
7030	4d	5d	7d	9 døgn		
					18.8. – 14⁰⁰	5.50
					18.8. – 14⁰⁰	5.50
					19.8. – 13⁰⁰	28.10
					19.8. – 15⁰⁰	30.10
					19.8. – 7⁰⁰	18.50
					19.8. – 19⁰⁰	33.50
5	6	7	8	8		9 døgn
		(Afbrudt 27.8. – 8⁰⁰)				
					18.8. – 24⁰⁰	15.30
					20.8. – 12⁰⁰	50.40
6½	7	9	A		25.8. – 8⁰⁰	7 døgn

kromsyreknoglen i vand fra kl. 18⁰⁰ til 22⁰⁰ = 4 timer.

Røntgenforsøg

Bestemmelse af afkalkningens forløb og slutpunkt ved anvendelse af og salpetersyre ved stuetemperatur (23–22° C.)

Dato	25.8.					26.8.						27.8.	
Klokkeslet	10	12	14	16	22	8	10	12	14	18	22	8	12
Tid (timer, min.)	2	350	540	730	1320	2310	25	2650	2840	3230	3620	4610	50
						1320	1510	17	1850	2240	(gælder for HC		
HCOOH, 10 %	2	3	4	5	8	9	10	P	A				
— , 20 %	2	3	4	5	10	11	A						
— , 40 %	1½	3	3½	4	8	9	10	P	L	A			
— , 85 %	0	½	1	2	3	4	4	5	5	5½	5½	6	7
HCOOH-citrat	½	½	2	3	4	6	7	7½	8	8	10	11	P
HCOOH-formiat	½	1	2	3½	5	8½	9	10	10	11	P	L	A
HCOOH-alkohol	0	½	1½	1½	2	3	4	4½	4½	5	5½	5½	6
HNO_3-alkohol	0	½	1	1½	1½	2	2½	3	3	3	3	3½	3½
HNO_3-formalin	5	10	P	A									
HNO_3-floro glucin	6	11	A										

I concentreret myresyre falder rygmarvspræparaterne af — kernepræparaterne

Røntgenforsøg

Bestemmelse af afkalkningens forløb og slutpunkt ved anvendelse af 1 10 normale

Dato	1.9.		2.9.						3.9.			
Klokkeslet	12	16	8	12	14	16	18	22	8	12	18	22
Tid (timer, min.)	4	750	2340	2730	2920	3110	33	3650	4640	5030	5620	6010
HNO_3	3	6	A									
HCl	3	6	L	A								
H_2SO_3	1	1½	3	4	4	4½	5	6	6	6	6½	7
H_3PO_4	½	1	2½	3½	3½	4	4	5	5	5	5	5½
H_2CrO_4	2	4	6½	8	8	8½	9	10	P	L	A	
HCOOH			3½	4½	5	5	5	5½	6	6	6½	7
CH_3COOH			0	1	1	1½	2	2	2	2	2½	2½
CCl_3COOH			8	10	P	L	A					
$C_3H_4OHCOOH$			3	3	3½	3½	3½	3½	4	4½	5	5
$C_6H_8O_7,H_2O$			2	2	2	2	2½	2½	3	3½	4	4

Som sædvanlig slimede udfældninger i citronsyren.

no. IX

forskellige styrker af myresyre samt forskellige blandinger af myresyre-
Påbegyndt 25. 8. 47 kl. 0800.

28.8.	29.8.	30.8.	1.9.	2.9.	Afkalknings-slutpunkt	Afbrydelser (dato og klokkeslet)	Ti-mer	Afkalkningstid (timer ell. døgn)
8	8	8	8	8				
6950	4 d	5	7	8				
OOH, 10—20—40 %)								
					26.8. – 14^{00}	25.8. – 22^{00}— 26.8. – 8^{00}	10	18.50
					26.8. – 10^{00}	25.8. – 22^{00}— 26.8. – 8^{00}	10	15.10
					26.8. – 16^{00}	25.8. – 22^{00}— 26.8. – 8^{00}	10	20.40
8	10	12	A		1.9. – 8^{00}			7 døgn
A					27.8. – 14^{00}	26.8. – 22^{00}— 27.8. – 8^{00}	10	42
					27.8. – 10^{00}	26.8. – 22^{00}— 27.8. – 8^{00}	10	
8	9	9	9½	9½	÷ afk. 2.9.			> 9 døgn
4½	6	7	7	8	÷ afk. 2.9.			> 9 døgn
					25.8. – 15^{00}			6.30
					25.8. – 14^{00}			5.40

ødelægges helt. Myresyre- og salpetersyrealkohol afbrydes 2.9.47.

no. X

syrer ved stuetemperatur (19°–20° C.). Forsøget påbegyndt 1. 9. 47 kl. 0800.

4.9.	5.9.	6.9.		7.9.	8.9.	9.9.	10.9.	11.9.	12.9.	Afkalknings-slutpunkt	Afkalkningstid (timer el. døgn)
8	8	8	17	8	8	8	8	8	8		
3½ d	4½	5½	6	6½	7½	8½	9½	10½	11½		
										2.9. – 8^{00}	23.40
										2.9. – 9^{00}	24.30
7½	9	11	14	P	A					8.9. – 8^{00}	7½ døgn
5½	7	9	10	11	14	P	A			10.9. – 8^{00}	9½ –
										3.9. – 14^{00}	52.20
8	11	P	A							6.9. – 12^{00}	5½ døgn
3	3½	4	5	5	5½	6	7	7	7½	÷ afk.	> 12 –
										2.9. – 17^{00}	32
5½	6	8	11	P	A					8.9. – 8^{00}	7½ døgn
5	5½	6	6½	7	8	9	10	12	P A	13.9. – 20^{00}	12 –

Kromsyrepræparatet bliver siddende denne gang.

Røntgenforsøg

Bestemmelse af afkalkningens forløb og slutpunkt ved anvendelse

Dato	2.9.						3.9.					4.9.	5.9.
Klokkeslet	10	12	14	16	18	22	8	12	16	18	22	8	8
Tid (timer, min.)	2	350	540	730	920	1310	23	2650	3040	3230	3620	4610	70
HNO_3	7	12	A										
HCl	7	12	A										
H_2SO_3	3	4	5	$5\frac{1}{2}$	$6\frac{1}{2}^k$	8^k	A^k						
H_3PO_4	2	3	4	$4\frac{1}{2}$	5	6	9	10	11	12	13	A	
H_2CrO_4	$3\frac{1}{2}$	5	7	9	11	A							
HCOOH	1	3	4	$4\frac{1}{2}$	5	6	9	10	P	A			
CH_3COOH	0	0	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	$1\frac{1}{2}$	2	2	4	4	4	$4\frac{1}{2}$	5
CCl_3COOH	$3\frac{1}{2}$	5	7	8	10	13	A						
$C_2H_4OHCOOH$	$\frac{1}{2}$	1	$2\frac{1}{2}$	3	4	5	7	7	8	9	11	A	
$C_6H_8O_7,H_2O$	0	$\frac{1}{2}$	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$	4	5	5	5	5	$5\frac{1}{2}$	7

Kernepræparaterne i citronsyren faldt af under afkalkningen

Røntgenforsøg

Bestemmelse af forløbet og slutpunktet ved afkalkning med 1

Dato	9.9.					10.9.			11.9.			
Klokkeslet	12	14	16	18	22	8	12	18	8	12	17	22
Tid (timer, min.)	4	550	740	930	1320	2310	2700	3250	4640	5030	5520	6010
HNO_3	6	9	P	A								
HCl	6	9	11	A								
H_2SO_3	2	3	$3\frac{1}{2}$	5	$5\frac{1}{2}$	8^k	10^k	A^k				
H_3PO_4	$1\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4	6	$6\frac{1}{2}$	7	10	11	P	A
H_2CrO_4	$3\frac{1}{2}$	5	6	7	9	A						
HCOOH	1	2	2	$2\frac{1}{2}$	3	5	6	7	9	11	13	A
CH_3COOH	0	0	0	$(\frac{1}{2})$	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	3	3
CCl_3COOH	$2\frac{1}{2}$	4	5	$5\frac{1}{2}$	6	11	A					
$C_2H_4OHCOOH$	0	1	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	$3\frac{1}{2}$	4	5	5	$5\frac{1}{2}$	$5\frac{1}{2}$
$C_6H_8O_7,H_2O$	0	$\frac{1}{2}$	1	1	$1\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$	4	4

no. XI

af 1 normale syrer ved 33° C. Påbegyndt 2. 9. 47 kl. 0800.

6.9.	7.9.	8.9.	9.9.	10.9.	Afkalknings-slutpunkt	Afbrydelser (dato og klokkeslet)	Ti-mer	Afkalkningstid (timer el. døgn)
8	8	8	8	8				
4d	5	6	7	8				
					2.9. – 13^{00}			4.40
					2.9. – 13^{00}			4.40
					3.9. – 8^{00}			23
					4.9. – 5^{00}	4.9. – 5^{00}—8^{00}	3	43.10
					2.9. – 21^{00}			12.10
					3.9. – 17^{00}			31.30
6	7	9	P	A	10.9. – 8^{00}			8 døgn
					2.9. – 24^{00}			15
					4.9. – 5^{00}	4.9. – 5^{00}—8^{00}	3	43.10
8	11	P	A		9.9. – 8^{00}			7 døgn

og gik itu under forsøg på at anbringe dem på objektglasset pæny.

no. XII

normale syrer ved 4° C. Forsøget påbegyndt 9. 9. 47 kl. 0800.

12.9.	13.9.	15.9.	16.9.	17.9.	18.9.	19.9.	22.9.	Afkalknings-slutpunkt	Afkalkningstid (timer ell. døgn)
8	8	8	8	8	8	8	13		
3½d	4½	6½	7½	8½	9½	10½	13½		
								9.9. – 18^{00}	9.30
								9.9. – 18^{00}	9.30
								10.9. – 18^{00}	32.50
								11.9. – 22^{00}	60.10
								10.9. – 6^{00}	21.10
								11.9. – 22^{00}	60.10
3½	4	5	7	7½	8	10	P	Afsl. 22.9.	13 døgn
								10.9. – 10^{00}	25
6	7	P	A					16.9. – 8^{00}	7½ d.
4½	5	8	9	P	L	A		19.9. – 8^{00}	10½ d.

Røntgenforsøg

Bestemmelse af afkalkningens forløb og slutpunkt ved stuetemperatur (20°–18° C.). For-

Dato	23.9.		24.9.			25.9.			26.9.	
Klokkeslet	12	18	8	12	18	12	18	22	8	18
Tid (timer, min.)	4	950	2340	2730	3320	5110	57	6050	7040	8030
HCOOH-bl. 1	0	½	2	2½	3	4	5	6	7	7½
— 2	0	1	3½	4	5	6½	7	7	8	10
— 3	½	1½	4	5	6	7	9	11	P	A
— 4	½	2	4	5	6	7	8	9	10	11
— 5	1	2½	4½	6	6½	9	P	A		
— 6	1½	3	6½	7	9	10	P	A		
— 7	2	3½	6	7	9	10	P	A		
— 8	2½	3½	8	12	A					
— 9	3	5	10	A						
— 10	3½	6	P	A						

Røntgenforsøg

Bestemmelse af afkalkningens forløb og slutpunkt med Lanthan-blandinger og af indflydelsen af overafk. på kernepræparaterne).

Dato	8.10.			9.10.		
Klokkeslet	12	17	22	7	12	17
Tid (timer, min.)	4	850	1340	2230	2720	3210
HCOOH-bl. 5		2½	3½	5	6	7
— 6		3½	4½	6½	7	8
— 7		3½	5	6	7	8
— 8		4	5½	8	12	A
— 9		5	7	11	A	
— 10	2½	5	7	12	A	
La-CH_3COOH	0	0	0	0	0	0
3 n CH_3COOH	0	½	1	1½	3	3
La-HNO_3	7½	P	A			
3 n HNO_3	7½	A				

*) Endnu 11.11.47 ingen antydning af afkalkning. Knoglen

no. XIII

anvendelse af myresyre-formiatblandingerne 1–10 ved søget påbegyndt 23. 9. 47 kl. 0800.

27.9.	28.9.	Afkalknings-slutpunkt	Afbrydelser (dato og klokkeslet)	Timer	Afkalkningstid (timer el. døgn)
8	8				
9420	11810				
8	A	28.9. – 8^{00}			5 døgn
A		26.9. – 24^{00}			$3\frac{1}{2}$ –
		26.9. – 12^{00}			3 –
A		26.9. – 24^{00}			$3\frac{1}{2}$ –
		25.9. – 22^{00}			$2\frac{1}{2}$ –
		25.9. – 19^{00}	24.9. – 18^{00}— 25.9. – 8^{00}	14	44.00
		25.9. – 20^{00}	24.9. – 18^{00}— 25.9. – 8^{00}	14	45.00
		24.9. – 18^{00}			33.20
		24.9. – 12^{00}			27.30
		24.9. – 10^{00}	24.9. – 6^{00}—8^{00}	2	23.40

no. XIV

med myresyreformiatblandingerne 5–10. (Ved sidstnævnte desuden bestemmelse Påbegyndt 8. 10. 47 kl. 0800.

10.10.	11.10.	13.10.	15.10.	Afkalkningsslutpunkt	Afkalkningstid (timer ell. døgn)
8	8	8	10		
47	3d	5	7		
10	A			10.10. – 20^{00}	$2\frac{1}{2}$ d.
A				10.10. – 5^{00}	43
A				10.10. – 7^{00}	45
				9.10. – 17^{00}	32.10
				9.10. – 12^{00}	27.20
				9.10. – 10^{00}	25.20
0	0	0	0	÷ Afkalkn.	*)
$3\frac{1}{2}$	5	7	P	15.10. – 8^{00}	7 d.
				8.10. – 19^{00}	10.40
				8.10. – 17^{00}	8.50

er kridhvid og ligesom kantet af en hvid bræmme.

RÉSUMÉ

Le principal but de la présente étude a été d'indiquer une méthode de représentation histologique de l'oreille intérieure comportant la possibilité de colorier la substance Nissl des cellules ganglionnaires à l'aide de la laque gallocyanine-chromalun progressive. Pendant mon travail antérieur avec des expériments histologiques j'ai bien constaté l'excellence de cette méthode de coloriage pour l'illustration du système nerveux de l'oreille intérieure. Mais je n'ai pas réussi alors à réaliser la méthode puisque les préparations étaient incluses en colloïdine et qu'elles avaient été décalcifiées à l'acide concentré.

Il a fallu entreprendre une étude systématique de l'effet décalcifiant de differents acides comparé avec les résultats de la coloration, principalement appréciés d'après la méthode d'Einarson (1932), méthode de gallocyanine.

I.

Il est impossible de constater exactement, quand on a commencé à employer systématiquement la décalcification dans la technique histologique, puisqu'on a si courramment utilisé les différents acides comme fixatifs. La méthode semble s'être formée peu à peu au début du siècle passé à la base des anciennes méthodes de macération.

Ce n'est guère par hasard, que l'on a tôt commencé à employer les acides pour la décalcification aux études histologiques de l'oreille intérieure, puisque cet organe est si bien incapsulé dans l'os solide. Dans ce domaine on ne pouvait pas faire des sections taillées, comme on le faisait dans l'ostéohistologie. Cette méthode était encore très lente et ne pouvait pas servir pour faire des rubans de coupes (Hopewell-Smith).

L'examen de la littérature disponible n'a révélé que très peu d'études sur la décalcification et des études peu comprehensives. Les nouvelles à ce sujet parues pendant ces dernières 10–20 années sont singulièrement rares (Jaffe). Les grands manuels n'ont prèsque pas changé depuis les jusqu' à 43 années entre la première et la dernière édition, sauf quelques petits changement typographiques.

La possibilité de colorier les tissus décalcifiés avait très peu intéressé. A l'exception du travail de Lillie (1944) on n'a pas profité des moyens chimiques et biochimiques parus depuis ces dernières 10–20 années. Je dois surtout souligner, qu'il n'existe pas d'études comparatives sur la faculté décalcifiante et l'influence sur la coloration d'acides, dont la concentration est indiquée suivant la terminologie chimique (normalités).

II.

Compte est rendu des études antérieures systématiques sur la décalcification en examinant en même temps d'autres conditions ayant pu influencer le résultat définitif. De même on passe en revue d'autres études sur la décalcification pouvant intéresser le problème présent.

La plupart des études sur la décalcification soulignent l'importance d'une bonne fixation. Le plus souvent on y a utilisé des solutions aqueuses de formaline (4%–10%). Pour la décalcification dans l'otohistologie la littérature ancienne mentionne l'emploi de l'acide osmique pour la fixation, tandis que la littérature plus moderne indique principalement des fluides contenant du bichromate de potassium.

Les exigences auxquelles doit satisfaire la fixation, formulées par Peter Gray, sont référées.

Les anciennes études sur la décalcification soulignent l'importance du durcissement préalable dans des bains d'alcool de concentrations augmentantes. Ceci ne se fait guère plus. Sous ce rapport l'indication par *Hamberger et Hydén* (1945) de l'effet précipitant de lanthan sur les acides nucléiques des cellules ganglionnaires pourrait être d'un certain intérêt.

Un relevé des acides employés pour la décalcification fait voir, que leur nombre est très grand et les variations des types presque infinies. Ceci ne peut que souligner la médiocrité des méthodes. L'acide le plus généralement employé est l'acide azotique (2%–10%) en solution aqueuses ou alcooliques.

La plupart des auteurs ont constaté l'achèvement de la décalcification en coupant ou sondant les préparations. Très peu ont utilisé les méthodes chimiques bien plus ménageantes et un seul (*Hagens*) a employé la radiographie comme méthode routinière. Cette dernière méthode a été mentionnée par *Alexander et Fischer* et par *Schmorl*.

L'inclusion a donné lieu à des difficultés, qui n'ont pas pu être diminuées en employant du foie ou de la matière cérébrale. La technique a été beaucoup améliorée par l'emploi de la colloïdine et la paraffine, dont la première a surtout été employée pour l'inclusion de tissus osseux.

En ce qui concerne le coloriage en continuation de la décalcification il est remarquable, qu'en général seulement l'emploi des hématoxylines (surtout l'hématoxyline de fer) a permis de réussir de bonnes préparations, tandis que la coloration des tissus nerveux n'a généralement pas été un succès.

III.

Les recherches de l'auteur ont porté sur la fixation, la décalcification, le traitement supplémentaire et sur les résultats du coloriage en continuation de la décalcification.

En ce qui concerne la fixation on a distingué entre la méthode postmortelle et la méthode intravitale. La première méthode faisait voir des changements autolythiques très clairs, très prononcés dans les tissus des reins. Par contre la méthode de fixation intravitale donnait d'excellents résultats au point de vue morphologie et coloration. On n'a pas réussi une méthode universelle de fixation

permettant de produire, et des noyaux, et de la substance Nissl, avec le même bon résultat.

La méthode de fixation intravitale donnait ses meilleurs résultats après l'emploi de Susa ou de Kaformacet.

Pour les expériments de décalcification on utilisait d'abord des morceaux de côte (homo) de 1 cm de longueur. Comme la décalcification de ces pièces s'opérait d'une façon très inégale, on a fait des expériments préliminaires pour voir, si l'on pouvait utiliser des anneaux en os (substantia compacta, provenant de la fistule avant d'un cheval), puis on a adopté des disques circulaires du même tissus, diamètre 7.5 mm, épaisseur 2 mm, poids 170 mg. A la décalcification d'essai ces disques se trouvèrent être tout indiqués comme une sorte d'objets test.

Aux expériments préliminaires sur les morceaux de côte on contrôlait la marche de la décalcification par des sondages et des découpages. Pour les expériments principaux on employait exclusivement la radiographie. Cette méthode présentait l'avantage de permettre d'exprimer la marche de la décalcification par des chiffres en mesurant l'amincissement du bord des disques. Pour la lecture on utilisait un appareil de microfilm projetant les radiophotographies des disques sur un écran divisé en $^1/_{10}$ mm.

Comme matière décalcifiante on utilisait aux expériments préliminaires les acides et les concentrations indiqués dans la littérature. Pour les expériments principaux on calculait l'effet des acides exclusivement d'après leurs normalités (x gramme-équivalences par litre), puisque la décalcification suit bien les lois de la staechiométrie.

Pour juger la décalcification on mesurait les ions hydrogènes (le pH), on notait le temps et le progrès de la décalcification et la coloration résultant après l'emploi des différents acides dans différentes conditions (des acides usagés et non-usagés, des acides à 1 n., à 2 n. et à 0,1 n., et à 5°, 20° et 33°).

Le mesurage des pH fournissait un bon point de repère pour la concentration des acides, exprimée par leurs constantes de dissociation. Ces mesurages permettaient de déterminer les domaines d'emploi des acides organiques et anorganiques. On constatait que le domaine d'emploi était le plus grand pour les acides organiques.

Les expériments préliminaires sur des morceaux de côte accusaient des délais de décalcification correspondants à ceux indiqués dans la littérature. Les expériments sur les disques étaient pourtant plus univoques. On constatait que l'emploi d'acides à 2n. ne présentait aucun avantage sur l'emploi d'acides à 1n. Les acides à $^1/_{10}$ n. travaillaient très lentement ou ne pouvaient même pas achever la décalcification. On constatait également que les acides concentrés ne décalcifiaient pas toujours plus vite que les acides moins concentrés. Ce phénomène trouve peut-être son explication dans une activité réduite des ions à cause de la haute concentration des ions.

La marche de la décalcification pour les différents acides correspond très bien à leur concentration comme indiquée par leurs pK. L'allure de la courbe était linéaire pour tous les acides (raide pour les acides concentrés, moins incliné pour les acides faibles). Ceci fait voir bien clairement, que c'est la concentration en ions d'hydrogènes, qui influence le plus la marche de la décalcification.

La vitesse de la décalcification a bien été influencée par la température, mais moins que prévu. Ceci est dû au fait qu'il s'agit ici d'un procès hétérogène, où les surfaces de contact entre les deux phases sont très réduites.

L'emploi d'acides usagés ne changeait pas le délai ni la marche de la décalcification, sauf dans le cas de l'anhydride sulfureux usagé, où le délai fut considérablement augmenté. Les radiophotografies des disques décalcifiés à l'anhydride sulfureux et surtout ceux décalcifiés à l'anhydride usagé, accusent des dépôts blancs (riches en contrastes), que l'on devait soupçonner d'être des dépôts de gypse. Ce soupçon est fortifié par le fait que les dépôts sont spécialement prononcés dans les solutions usagées de l'anhydride sulfureux. Encore la chimie nous enseigne que l'anhydride sulfureux, en tant qu'agent de réduction, est très enclin à absorber l'oxygène de l'air pour se changer en acide sulfurique. Cet acide sulfurique se combine avec les sels calciques déjà solutionnés pour former des dépôts de gypse insoluble. Les expériments de *Schaffer* sur la solubilité du cendre des os, où il constatait des dépôts abondants, semblent indiquer la même chose. L'emploi de l'anhydride sulfureux pour la décalcification est donc à déconseiller.

L'emploi de solutions alcooliques des acides ou l'addition de formol ou de phloroglycine n'est pas justifié. Le seul effet en est une augmentation du délai de décalcification.

On a trouvé que l'acide formique et son sel sodique formaient un tampon qualifié. Ce mélange décalcifiait très effectivement ayant un pH plus élevé que les liquides de décalcification usités. Le mélange No 10 (des doses égales d'acide formique à 8n. et de formiate sodique à 1n. de pH = 2,2) donnait la même vitesse de décalcification que 40% et 20% d'acide formique (de pH 0,4 et 1,1 respectivement), malgré le pH plus élevé. Le mélange travaillait même plus vite que le mélange d'acide formique et de citrate (pH = 1,8) tellement vanté par les Américains.

La décalcification par électrolyse était sans valeur.

Pour apprécier les résultats du coloriage on s'est basé principalement sur la détermination photométrique de l'intensité des couleurs de préparations de noyaux spéciales coloriées à la gallocyanine. On a mis ces préparations de noyaux, montées sur verres d'objet, et de la moelle épinière de veau, fixée au formol, dans les différents acides jusqu' à ce que le disque en os fût décalcifié. Puis on a lavé les sections à l'eau pour les colorier ensuite. Les meilleurs résultats étaient obtenus avec l'acide formique à 1n. et à 2n. Les températures élevées ou très basses étaient inutiles; elles ont nui à la coloration des noyaux. L'emploi de solutions usagées n'a pas présenté des avantages. L'emploi de lanthan de même.

Tous les mélanges acide formique-formiate ont présenté les mêmes bons résultats uniformes de coloration. On a donc préféré le mélange (No 10), qui décalcifiait le plus vite.

En comparaison avec d'autres acides sous des conditions semblables, les mélanges d'acide formique n'ont pas donné des décalcifications trop poussées.

On a trouvé les mêmes résultats en examinant la coloration de la substance Nissl de la moelle épinière de veau.

Par une examination combinée de coloriage et au pycnomètre on a constaté

que le traitement supplémentaire au sulfate de sodium ou de lithium ne pouvait pas empêcher le gonflement ou le déséchage des tissus, tandis qu'il a considérablement réduit la possibilité de les colorier. Un tel traitement supplémentaire à l'aide de liquides alcalines est donc à déconseiller; il ne fait que perdre du temps.

IV.

L'aperçu historique de l'histologie de l'oreille intérieure met en évidence les difficultés énormes, qu'ont rencontrées les histologues dans ce domaine. Les difficultés sont dues au fait que l'oreille intérieure est incapsulée dans la substantia compacta dure. On a essayé de contourner les difficultés en faisant des préparations dépouillées à l'eau de mer, dans des solutions de sucre, dans du sérum iodé, dans humor aqueus etc. et l'on a beaucoup utilisé des embryons et des fétus pour ces recherches.

Tout comme l'histologie des os l'otohistologie présente une vraie abondance de méthodes de décalcification, ce qui ne fait que souligner l'inefficacité des méthodes.

Les essais de coloriage après la décalcification n'ont pas donné de bons résultats. Surtout on n'a pas réussi à représenter la substance Nissl des ganglions de l'oreille intérieure.

V.

Pour ses recherches dans l'histologie du labyrinthe l'auteur a essayé les liquides suivants pour la fixation (aux cobayes): 10% de formaline, le kaformacet, le susa, le sublimé alcoolique et le liquide de Carnoy. C'est le kaformacet, qui a donné les meilleurs résultats, comme déjà indiqué par Werner (1940). Le second par la qualité était le susa. Les autres liquides de fixation donnaient des mauvais résultats, déformant l'organe de *Corti* et les cellules ganglionnaires. Ceci est démontré par la microscopie ordinaire et par la microscopie contrastant les phases, sur des sections non-coloriées. Les résultats concordaient avec ce qu'on a trouvé dans les tissus des reins des mêmes animaux. On peut donc conseiller d'employer les reins comme objet de contrôle pour la fixation intravitale.

A l'aide de la radiospectrographie j'ai essayé de constater, si la dureté de la capsule du labyrinthe serait due à la présence de sels spéciaux ou éventuellement à une disposition spéciale de ces sels. Ce n'était pas le cas. La capsule du labyrinthe est donc égale au tissu osseux ordinaire.

Le délai de décalcification dépendait de l'âge de l'animal; pour le mélange acide formique-formiate il était d'ailleurs le double du délai trouvé pour l'acide azotique (5%) ordinairement employé.

L'inclusion devait être fait dans la paraffine par égard au coloriage de la substance Nissl à la gallocyanine. Le procédé suivant était le meilleur: Deshydration à l'alcool de plus en plus concentré jusqu' à l'alcool absolu, de l'huile de bois de cèdre pendant 24 heures, de la ligroïne pendant 1–2 heures, de la paraffine pendant 12 heures à 56°. On employait de la paraffine (point de fusion 54°) additionnée de 20% de cire jaune pour maintenir la plasticité pendant le refroidissement à 4–5° nécessaire pour le sectionnement en rubans. De cette façon on a réussi des sections de 6–7 microns.

L'examination de la coloration a démontré que la substance Nissl était très bien coloriée et dessinée dans les préparations décalcifiées à l'acide formique-formiate, tandis qu'il n'y avait pas la moindre trace de substance Nissl dans les préparations décalcifiées à l'acide azotique. Même si l'on utilisait d'autres méthodes de coloriage on a constaté qu'il y avait avantage à décalcifier à l'acide formique-formiate, bien que la méthode demande un peu plus de temps que la méthode à l'acide azotique (de 5%).

Pendant les mesurages finales du pH pendant la décalcification du labyrinthe on a réussi, à l'aide d'une technique spéciale, de trouver une explication probable du fait que l'organe de Corti se conserve si bien, malgré l'influence des acides concentrés. L'allure des courbes de pH a rendu probable, que l'indiffusion lente des acides et la concentration très élevée de sels de calcium à l'interieur de la capsule du labyrinthe ont retardé l'apparition dans le labyrinthe membraneux des valeurs de pH (au-dessous de 1) nuisibles aux tissus.

SUMMARY

The main purpose of these investigations was to find a method for making histological sections of the internal ear with possibility for staining the Nissl-substance of the ganglion cells with *Einarsons* gallocyanin-chromalum. In previous experimental-histological investigations the value of this staining method for judging the state of the nervous apparatus of the internal ear became evident to me. At that time I did not succeed with the method caused by the decalcification with strong acid and the imbedding in celloidin of the tissue blocks.

It proved necessary to do a systematic investigation on the decalcifying effect of various acids compared with the staining results mainly by means of *Einarsons* gallocyanin chromalum method.

I

It can not be established with certainty when one began to use systematic decalcification in the histologic technique because various acids were used extensively as fixatives. The method seems to have developed by degrees from the elder maceration methods at the beginning of the last century.

It seems to be no occurrence that acids as decalcifying means were used early in the histological investigation of the internal ear, a consequence of the capsulation of this organ in compact bone. In the investigations on this subject it was not as in bone histology possible to make ground sections. Furthermore this sort of investigation was very timeconsuming and could not at all be used for making serial sections (*Hopewell-Smith*).

In the litterature I found only very few and incomplete investigations on the decalcification. Moreover it is a striking fact that in the last decades only little new has been brought forward about the decalcification. (*Jaffe*).

The great manuals are still unaltered, even with intervals of 43 years between the first and last edition.

The stainability of the tissues after decalcification was treated stepmotherly. Except for *Lillies* paper (1944) chemical and biochemical remedies have not been used. It must be emphazised that there was found no comparing investigations on the ability of decalcification and the influence on the stainability of acids, the concentration of which was given in normalities.

II

Previous, systematic investigations on the decalcification and other circumstances of value for the final result, and furthermore not systematic investigations on decalcification of some interest in this connection are accounted for.

In most of the researches on decalcification the importance of a good fixation is emphazised. 4—10% aqueous solution of formalin is most frequently used. By the decalcification of the internal ear osmium acid was used earlier for fixation, whereas now potassium dichromate is mostly used.

The proper conditions for fixation set up by *Peter Gray* are referred.

In previous investigations stress was laid upon the hardening of the tissue blocks in increasing strength of alcohol before the decalcification. This is practically abandoned. In this respect *Hamberger & Hydens* report (1945) on the precipitating effect of Lanthane on the nucleic acids of the ganglion cells might be of some interest.

A review of the different acids used for decalcification shows that the number of these are very great with a lot of variations, which make the deficiency of the methods evident. The acid most preferred is an aqueous or alcoholic solution of nitric acid (2—10%).

To decide when the decalcification is complete, most authors cut or prick into the preparations. Only a few have employed the more preservative chemical methods and only *Hagens* used the x-ray method as a routine.

The old imbedding technique with the use of liver or brain tissue as imbedding material gave a lot of trouble. The technique was much improved when paraffin and celloidin came into use. Celloidin has been employed mostly for the imbedding of bony material.

It is well worth notifying that hematoxylin only (specially iron hematoxylin) is able to give good results, when staining preparations after decalcification. The staining of nerve tissue is usually not very successful this way.

III

The fixation, decalcification, treatment after decalcification and the staining results in my own material are considered.

Concerning fixation one must distinguish between fixation post mortem, which is more frequently employed, and fixation intra vitam, the first method giving

distinct autolytic changes specially in the kidneys, the latter giving excellent results concerning morphology and stainability. I did not succeed in finding a single method which enabled me to stain nuclei and Nissl-substance equally well.

The intra vitam method of fixation with Kaformacet or Susa, gave the best results.

About 1 cm. long pieces of human rib were employed in the beginning of my investigations on the decalcification rate. As the results were independable using human ribs, circular platelets of substantia compacta from horse (diameter of 7.5 mm, thickness of 2 mm and weight of 170 mg) were used instead. These platelets turned out to be excellent.

In the main investigations x-ray photographs were exclusively used to judge the progress of the decalcification, enabling me to express the course in figures by registration of the concentric narrowing of the calcium shadow. It was done by means of a microfilm viewer where the pictures of the platelets were projected on a $^1/_{10}$ mm. scale.

As decalcifying agents acids of strength and composition as stated in the litterature were partly used, and partly acids whose strength were given in normalities (gram equivalents per liter). The decalcification is a chemical process ruled by the stoechiometric laws. It is therefore irrelevant to express the strength of the acids in percentages, the more so because these percentages are originally empirically found.

For further judgment of the decalcification process pH-measurements and determinations of rate and course of the decalcification compared with the staining results with a acids of various strengths and conditions (for instance used and unused acids, 1 N, 2 N, and $^1/_{10}$ N acids, and temperatures of 5, 20 and 33 degrees) were employed.

pH-measurements turned out to be useful for the estimation of the strength of the acids expressed by their dissociation constants. By means of the pH-measurements one was able to define strictly the use of organic and inorganic acids. The organic acids turned out to have the greatest field of use.

The human rib investigations showed decalcification rates corresponding to what is found in the litterature. The investigations of the bone platelets were more uniform. The use of 2 N acids did not offer any advantage to 1 N acids. $^1/_{10}$ N acids were either very slowly working or they were not able to perform complete decalcification. One could not always expect that acids of high concentration decalcified quicker than the same acids of a lower concentration. This can possibly be explained by decreased ion-activity as caused by the high ion-concentration.

The course of the decalcification by different acids correspond perfectly to the strength of these acids measured by the dissociation exponent. Graphically the course was linear for all acids (steep for the strong acids and sloping for the weak acids). This fact shows that the hydrogen ion concentration plays the greatest rôle by the decalcification procedure.

Changes of temperature caused some alterations in the decalcification rate but not as much as expected. This is due to the heterogenousness of the decalcification process, where the surfaces of contact between acid and bone are very small.

Previously used acids did not give any differences in the rate or course of the decalcification with exception of sulfurous acid, where the time of decalcification increased considerably. The radiograms of the bone platelets decalcified by sulfurous acid showed sedimentations that had to be considered as gypsum.

This consideration was confirmed by the appearance especially in formerly used solutions of sulfurous acids.

This is furthermore confirmed by the fact that sulfurous acid is apt to be converted into sulfuric acid because its reducing faculties. The produced sulfuric acid combines with the dissolved calcium salts into insoluble gypsum which is sedimentated. *Schaffers* observation of the appearance of sedimentations in his investigations on the solubility of bone ash in sulfurous acid points in the same direction. It is therefore not advisable to use sulfurous acid for decalcification purposes.

The use of alcoholic solutions of acids or addition of formalin or phloroglucin has no justification. The only prolong the rate of decalcification.

Formic acid and its sodium salt provides a buffer solution of the wanted qualifications. The mixture effectively decalcified at a higher pH than the usual decalcification fluids. Formic acid- formiate mixture no. 10 (i.e. even parts 8 N formic acid and 1 N sodium formiate, pH = 2.2) have the same decalcification rate as 40 and 20 per cent formic acid (pH 0.4 and 1.0) in spite of the lower pH of the latter. The mixture was still superior to the formic acid- sodium citrate mixture with the pH 1.8, which the Americans recommend so much.

The decalcification with the help of electrolysis was of no value.

By the judgment of the staining results the stress is laid upon photometric measuring of the colour intensity in nucleus preparations stained with the gallocyanin. These preparations mounted on slides were put into various solutions of acids untill the bone platelets were decalcified, and at the same time preparations of calves medulla spinalis fixed in formalin were added, in order to control the staining of the Nissl-substance. The 1 N and 2 N formic acids gave the best results. High and low temperature was an disadvantage as the nucleus staining was damaged. Used solutions and Lanthane was no advantage either.

All the formic acid-formiate mixtures gave good and uniform results and that is the reason why the quickest decalcifying mixture, namely no. 10 is preferred. Compared with other acids under similar conditions the formic acid-formiate mixtures did not damage the preparations even if they remained in the acid after the decalcification was ended.

An aftertreatment with sodium- or lithium sulphate can not prevent swelling or shrinking of the tissues controlled by a combined staining and pycnometer investigation. On the other hand the aftertreatment produced a distinct decrease of the stainability of the tissues. It must therefore be advised against an aftertreatment with alkaline solutions as it furthermore is waist of time.

IV

A historical review of the histology of the internal ear shows distinctly how many difficulties the histologists have met in this field. The cause is the incapsul-

ation of the internal ear in compact bone substance. One tried to avoid the difficulties by making of pinch preparations in ocean-water, sugar solutions, iodine serum, humor aquaeus and so on, and embryones and foetuses were used for the investigations.

Just as in the general bone histology one will find a number of decalcification methods used in the oto-histology proving the inefficiency of the methods. Specially it has been without success to stain the Nissl-substance in the ganglions of the internal ear.

V

The following fluids have been used for fixation in my own investigations of the histology of the guinea-pig labyrinth: 10 per cent formalin, Kaformacet, Kaformisal, sublimate-alcohol, Carnoy fluid. Kaformacet gave the best results confirming *Werners* investigations (1940). Susa came next. The other fluids gave bad results causing defigurations of Cortis organ and the ganglion cells. This is shown by simple microscopy and by phase contrast microscopy on unstained sections.

By intra vitam fixation one will find the renal tissue react in the same way as organon of Corti wherefore it is advised to use the kidneys as control objects.

I tried to find out if the hardness of the bony labyrinth capsule is caused by the presence of special salts, eventually a special arrangement of the salt crystals. For this purpose x-ray spectrography was used. I could not find anything extraordinary of that sort, and therefore the labyrinth capsule must be considered as ordinary bone structure.

The decalcification rate depends upon the age of the animals. It takes twice as long time to decalcify with formic acid-formiate mixture as with 5 per cent nitric acid.

The imbedding has to take place in paraffin due to the staining of the Nissl-substance with gallocyanin.

The following method is the best: Dehydration in increasing strength of alcohol up to absolute alcohol, then immersion in cedar oil for 24 hours, in ligroin for 1—2 hours, in paraffin for 12 hours at the temperature of 56 centigrades. The paraffin employed has a melting point at 54 centigrades and is mixed with 20 per cent yellow bee wax to preserve the softness during the cooling off the preparations (4—5 centigrades) which is necessary for the making of serial sections. In this way one can produce sections of 6—7 mikrons.

The Nissl-substance is excellently stained and contoured in the preparations decalcified by formic acid-formiate mixture whereas there is no visible Nissl-substance in the preparations decalcified by nitric acid.

By some final pH-measurements in the labyrinths itself during the decalcification it succeeded by means of a special technique to find a possible explanation, why organon of Corti is so well preserved in spite of the action of strong acids. The pH-curves seemed to show that the slow diffusion of the acids combined with a high concentration of calcium salts inside the labyrinth capsule delay the production of pH-values (below 1), which would damage the tissues in the membranous labyrinth.

LITTERATURFORTEGNELSE

1. *Agazzi, C.:* „Quelques recherches d'anatomie microscopique sur l'innervation et sur la vascularisation de l'oreille interne". Pract. oto-rhino-laryng. 7: 83, 1945. (125).
2. *Alagna, G.:* „Ueber das Vorkommen von mitochondrialen Gebilden im Hörapparat". Ztschr. f. Ohrenh. 70: 19, 1914. (137).
3. *Alagna, G.:* „Beitrag zur histologischen Technik des menschlichen Labyrinths". Ztschr. f. Ohrenh. 61: 37, 1910. (47, 135).
4. *Alexander, G. & J. Fischer:* „Präparationstechnik des Gehörorganes". Wien. 1925. Pp. 184, p. 90. (26, 33, 34, 35, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 66, 67, 118, 123, 134, 137).
5. *Andeer:* „Das Resorcinderivat Phloroglucin". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 2: 375, 1885. (16, 18, 38, 94).
6. *Bauer, W.:* „Histologie retinierter Zähne mit besonderer Berüchsichtigung der Frage der Genese der Osteoklasten". Ergebn. d. ges. Zahnh. Heft 1: 10, 1914. (33, 38, 43, 118).
7. *Bean, R. J.:* „Stain Technic for Nissl Granules Following Alcohol-Formol Fixation". Stain Techn. 2: 56, 1927. (37).
8. *Beck, K.:* „Die Technik der intravitalen Durschspülung....". Ztschr. f. Ohrenh. 72: 113, 1915. (35, 49, 50).
9. *Bielschowsky, M.:* „Histopathology of Nerve Cells". In: Penfield, W.: Special Cytology. Vol. I. New York. 1932. P. 147. (37, 136, 151).
10. *Bjerrum, N.:* „Lærebog i uorganisk kemi". København 1937. Pp. 391, p. 80. (10, 81).
11. *Bjerrum, N. & J. K. Gjaldbæk:* „Undersøgelser over de faktorer, som bestemmer jordbundens reaktion". Meddelelse fra Kgl. Vet.- & Landbohøjskole. Kbh. 1919. (79).
12. *Boettcher, A.:* „Ueber Entwicklung und Bau des Gehörlabyrinths...". Dresden. 1869. Pp. 203, p. 1. (13, 27, 29, 33, 34, 41, 43, 44, 47, 127, 128).
13. *Brandenberger & Schinz:* „Ueber die Natur der Verkalkungen bei Mensch.....". Helvet. med. Acta 12: 1, 1945. (9, 148).
14. *Brinch, O.:* „Experimentelle og kliniske undersøgelser over rodbehandling af tænder..". Kbh. 1935. Pp. 210, p. 32. Disp. (33, 35, 38, 42, 43, 45, 46, 78, 118).
15. *Busch, F.:* „Zur Technik der mikroskopischen Knochenuntersuchung". Arch. f. mikr. Anat. 14: 480, 1877. (13, 14, 26, 34, 38, 41, 46, 66, 93, 117).
16. *Bøhm, A. & v. Davidoff:* „Histologie und mikroskopische Technik". Berlin 1903. Pp. 417, p. 372. (33, 34, 40, 125, 132).
17. *Chilow, K.:* „Ueber den feinsten Bau der Labyrinthbildungen". Monatschr. f. Ohrenh. 59: 299, 1925. (36, 49, 50).
18. *Claudius, M.:* „Bemerkungen über den Bau der häutigen Spiralleiste der Schnecke. Ztschr. f. wiss. Zool. 7: 154, 1856. (41, 127).
19. *Colcqhoun:* „Methods of Demonstration the Canaliculi". J. anat. phys. 34: 89, 1900. (18, 39).
20. *Corti, A.:* „Recherches sur l'organe de l'ouie des mammiferes". Ztschr. f. wiss. Zool. 3: 109, 1851. (35, 41, 47, 125).
21. *Cowell, W. P.:* „A cytologic Study of the Effects of Drugs on the Cochlea". Arch. otolaryng. 23: 633, 1936. (34, 36, 41, 47, 49, 133, 137).
22. *Cowell, W. P.:* „The Peripheral Endings of the Cochlear Nerve". Ann. Otol. Rhin. & Laryng. 47, 63, 1938. (133).

23. *Cowdry, E. V.:* „Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System". In: Penfield, W.: Special Cytology. Vol. I. New York. 1932. P. 1. (37, 151).
24. *Custer, R. P.:* „Am. J. M. Sc." 185: 617, 1933 (cit. efter Gormsen, H.: Knoglemarvsundersøgelser. Kbh. 1942. Pp. 394, p. 27. Disp.). (22, 39, 46, 48, 76, 95).
25. *Davenport, H. A.:* „Staining Nerve Fibres in Mounted Sections...". Arch. Neurol & Psychiat. 24: 690, 1930. (153).
26. *Davenport, H. A.:* „Silver Impregnations of Nerve Fibres in Celloidin Sections". Anat. Rec. 44: 79, 1929. (153).
27. *David, L. T.:* „A Method of Preparing Paraffin Sections of Bone". Science. 82: 179, 1935. (43, 151).
28. *Deiters, O.:* „Erklärung, die Lamina spiralis membranacea, betreffend". Arch. f. path. Anat. 19: 445, 1859. (41, 125).
29. *Deiters, O.:* „Untersuchungen über die Lamina spiralis membranacea". Bonn. 1860. Pp. 114, p. 1. (41, 125, 127).
30. *Delaney, A.:* „Reliable Methods for the Fixation and the Staining of Nissl Substance...". Anat. Rec. 36: 111, 1927. (37, 146).
31. *Denker, A. & Kahler:* „Handbuch der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde". Berlin. 1926. (137).
32. *Duval, M.:* „Technique de l'emploi du collodion humide...". J. de l'anat. et de la physiol. 15: 185, 1879. (43, 131, 135).
33. *v. Ebner, V.:* „Ueber den feineren Bau der Knochensubstans". Sitzungbericht. Akad. Wiss., Wien. 72: 58, 1875. (16).
34. *Einarson, L.:* „A Method for Progressive, Selective Staining of Nissl Subst....". Am. J. Path. 8: 295, 1932. (73, 99).
35. *Einarson, L.:* „Notes on the Morphology of the Chromophil Material of Nerve". Am. J. Anat. 53: 141, 1933. (146, 151).
36. *Einarson, L.:* „Histological Analysis of the Nissl-Pattern...". J. Comp. Neurol. 61: 101, 1935. (37, 110, 153).
37. *Einarson, L.:* „Om nervecellernes indre struktur". Acta Jutlandica. 17: 31, 1945. (74, 112, 151).
38. *Einarson, L. & Bentsen:* „Bemerkungen zur progressiv-elektiven färberischen Darstellung der Nervenzellen...." Ztschr. f. wiss. Mikr. 56: 265, 1939. (152, 153).
39. *Eschweiler, R.:* „Zur vergleichende Anatomie der Muskeln und der Topographie des Mittelohres verschiedener Säugethiere. Arch. mikr. Anat. 53: 560, 1899. (33, 34, 39, 42, 43, 118, 132).
40. *Evans, N. & A. Krajian:* „New Method of Decalcification". Arch. Path. 10: 447, 1930. (2, 34, 39, 45, 95, 118).
41. *Falbe-Hansen, J.:* „Clinical and Experimental-Histological Studies on Effects of Salicylate and Chinine on the Ear". Kbh. 1941. Pp. 216, p. 91. (49, 50, 95). disp.
42. *v. Fieandt & A. Saxen:* „Ein Vakuumverfahren bei der Celloidineinbettung". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 49: 60, 1932. (33, 43, 44, 136, 137).
43. *Fischer, J.:* „Ueber die Verwendbarkeit der Paraffineinbettung". Monatschr. f. Ohrenh. 54: 593, 1920. (43, 44, 135, 151).
44. *Flemming, W.:* „Surrogate für Knochenschliffe". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 3: 47, 1886. (14).
45. *Flesch, M.:* „Die Anwendung von Gemischen von Chromsäure und Osmiumsäure zur Untersuchung des Gehörorgans kleinerer Thiere". Arch. mikr. Anat. 16: 300, 1879. (34, 40).
46. *Forshufvud, S.:* „Eine Entkalkungsmetode". Acta odont. Scandinav. 6: 19, 1944. (39, 78).
47. *Frey, H.:* „Handbuch der Histologie und Histochemie des Menchen". 5. Aufl. Leipzig. 1876. Pp. 747, p. 718. (9).
48. *Gerlach, J.:* „Handbuch der allgemeine und spezielle Gewebelehre des menschlichen Körpers". Mainz. 1854. Pp. 555, p. 132, 185, 521. (9, 10, 12).
49. *Gormsen, H.:* „Knoglemarvsundersøgelser". Kbh. 1942. Pp. 394, p. 27. Disp. (22, 39, 46, 48, 76, 95).

50. *Goto, S.:* „Die Anatomie des Saccus endolymphaticus des Meerschweinchens". Ztschr. f. Otol. (Tokio). 34: 35, 1928. (137).
51. *Gottstein, J.:* „Ueber den feineren Bau und Entwicklung der Gehörschnecke". Arch. f. mikr. Anat. 8: 146, 1872. (13, 34, 35, 40, 43, 129).
52. *Gray, P.:* „Notes on the Practical Fixation for Animal Tissue". J. Roy. Micr. Sc. 53: 13, 1933. (36, 61).
53. *Hagens, E. W.:* „Decalcification of Temporal Bones". Arch. Otolaryng. 12: 14, 1930. (26, 39, 41, 42, 66, 67, 93, 136).
54. *Hamberger, C. A. & H. Hyden:* „Cytochemical Changes in the Cochlear Ganglion. . .". Acta oto-laryng. Suppl. 61. Lund. 1945. Pp. 89, p. 20. (23, 34, 37, 40, 43, 110, 134).
55. *Hannover:* Mikroskopiske undersøgelser af nervesystemet. København, 1842. Bianco Luno. (125).
56. *Harless:* I Wagners Handwörterbuch der Physiologie. Hören. Bd. 4. P. 441, 1853 (125).
57. *Hasse, C.:* „Das Gehörorgan der Frösche". Leipzig. 1868. Pp. 62, p. 1. (41, 47, 125, 127).
58. *Haug, R.:* „Die gebräuchlichsten Entkalkungsmethoden". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 8: 1, 1891. (16, 18, 26, 38, 41, 45, 89, 94, 99, 117).
59. *Henriques, O. M.:* „Om brintionmålinger". Kbh. 1924. Pp. 128, p. 52. (88).
60. *Hensen, A.:* „Ueber Entwicklung und Bau des Gehörlabyrinths". Arch. f. Ohrenh. 3: 3. 1873. (13, 33, 34, 40, 41, 43, 47, 127, 129).
61. *Herxheimer, G.:* „Entkalkung". In: Abderhalden, E.: „Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden". Abth. 8, Theil 1. 1924. P. 24. (32, 34, 38, 41, 42, 43, 45, 69, 84, 88, 117, 117).
62. *Hodgman, C. D.:* „Handbook of Chemistry and Physics." Ohio 1945. Pp. 2640, p. 360, 1332, 1350, 1388. (79).
63. *Hoessli, H.:* „Weitere experimentelle Studien über die akustische Schädigung des Säugethierlabyrinths". Ztschr. f. Ohrenh. 64: 101, 1912. (33, 36, 43, 47, 49, 133, 151).
64. *Hoff-Jørgensen, E.:* „Vejledning i titreranalyse". Kbh. 1948. Pp. 56, p. 17. (94).
65. *Holter, C.:* „Personlig meddelelse". (72).
66. *Hopewell-Smith, A.:* "Dental Microscopy". London 1895. Pp. 119, p. 14, 39. (16, 17, 38, 45, 84, 118, 226).
67. *Hopkins, A. E.:* „The Appearance of Nissl Substance in Nerve Cells. . .". Anat. Rec. 28: 157, 1924. (37, 104).
68. *Hyrtl, J.:* „Vergleichend-anatomische Untersuchungen über das innere Gehörorgan. .". Prag 1854. Pp. 139, p. 91. (12, 126).
69. *Iwasa, M.:* „Cytologischen Studien am Gewebe des membranösen Labyrinthes des Meerschweinchens". Fol. anat. Jap. 3: 313, 1925. (137).
70. *Jaffe, H. L.:* „Methods for Histological Study of Normal and Diseased Bone". Arch. Path. 8: 817, 1929. (20, 22, 23, 33, 34, 38, 41, 42, 45, 66, 76, 77, 93, 94, 95, 117, 118).
71. *Tovborg Jensen, A.:* „Røntgenmetoder og deres anvendelse i kemien". Kemisk månedsblad. 19: 4, 1938. (148).
72. *Tovborg Jensen, A. & J. E. Thygesen:* „Om stofferne i urinvejenes fosfatkonkrementer". Ugeskrift for Læger. 101: 115, 1939. (148).
73. *Tovborg Jensen, A. & E. Møller:* „Investigations in the Properties of the Tooth Enamel by Means of X-rays". Acta odont. Scandinav. 6: 7, 1944. (148).
74. *Johansen, E. V.:* „Undersøgelser over det indbyrdes størrelsesforhold mellem cornea og lens crystallina hos mennesket". Kbh. 1947. Pp. 147, p. 19. Disp. (121).
75. *Katz, L.:* „Ueber eine Methode, makroskopische Präparate des Gehörorgans durchsichtig zu machen". Arch. f. Ohrenh. 34: 215, 1893. (33, 34, 131).
76. *Kelemen, G.:* „The Junction of the Nasal Cavity and the Pharyngeal Tube in the Rat". Arch. laryng. 45: 159, 1947. (34, 38, 43, 46).
77. *Klebs, E. K.:* „Die Einschmelzungsmethode". Arch. f. mikr. Anat. 5: 164, 1869. (137).
78. *Koelliker, A.:* „Handbuch der Gewebelehre des Menschen". Leipzig 1852. Pp. 637, p. 632. (12, 13, 35, 40, 41, 125, 126).

79. *Kolin, M.:* „Technique for Sectioning Soft Bones and Hard Tissues by Celloidin and Paraffin Methods". Arch. Path. 33: 86, 1942. (22, 34, 39, 43, 118).
80. *Kolmer, W.:* „Erfahrungen über die Fixation ganzer Thiere". Anat. Anz. 42: 47, 1912. (34, 35, 49, 134).
81. *Krause, R.:* „Enzyklopädie der mikroskopischen Technik". Berlin 1903. P. 424. (20, 33, 38, 43, 49).
82. *Krause, R.:* „Enzyklopädie der mikroskopischen Technik". Berlin-Wien 1926. P. 835. (20, 33, 34, 36, 38, 41, 45, 47, 49, 77, 78, 84, 94, 117, 118, 125, 132, 133).
83. *Kristensen, H. K.:* „Sur la position des membranes de l'oreille interne". Acta oto-laryng. 33: 225, 1945. (34, 36, 39, 42, 43, 47, 48, 49, 95, 118).
84. *Kristensen, H. K.:* „Sur les methodes de coloration pour l'examen histologique de labyrinthes...". Acta oto-laryng. 33: 315, 1945. (152).
85. *Kuhn:* „Untersuchungen über das häutige Labyrinth der Knochenfische". Arch. mikr. Anat. 14: 264, 1877. (34, 35, 41, 43, 47, 125, 129).
86. *Lagally, H.:* „Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie des Labyrinthes". Beitr. z. Anat., Phys., Path. u. Ther. d. Ohres. 5: 73, 1912. (36, 49).
87. *Lagerstedt, S.:* „Gallocyanin as a Specific Method for Production of Protein Inclusions in Liver Cells". Acta anat. 2: 392, 1947. (74, 99).
88. *Landolt-Bjørnstein:* "Physikalisch-kemische Tabellen". Berlin 1936. (79).
89. *Lang, F. J. & L. Haslhofer;* „Entkalkung". In: Abderhalden, E.: „Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abth. 8, Theil 1, 2. Hälfte. 1935. P. 1458. (32, 38, 42, 43, 45, 77, 78, 84, 117, 118.
90. *Langeron, M.:* „Precis de microscopie". Paris 1934. Pp. 1205, p. 315. (20, 32, 34, 39, 42, 45, 77, 78, 84, 117).
91. *Lee, A. B.:* „The Microtomists Vademecum". London 1885. Pp. 424, p. 296. (14, 117).
92. *Lee, A. B.:* „The Microtomists Vademecum". London 1928. Pp. 710, p. 258. (20, 34, 38, 77, 84,).
93. *Lepkowski, W.:* „Beitrag zur Histologie des Dentins...". Anat. Anz. 7: 274, 1892. 16, 17, 39, 45).
94. *Lillie, R. D.:* „Studies on the Decalcification of Bone". Am. J. Path. 20: 291, 1944. (21, 23, 24, 27, 29, 30, 31, 40, 45, 46, 48, 70, 76, 78, 80, 84, 88, 93, 95, 99, 101).
95. *Lillie, R. D.:* „Histopathologic Technique". Philadelfia 1947. Pp. 300, p. 38. (96).
96. *Lindahl, P. E.:* „Methode de decalcification des objets riches en carbonate...". Bull. d'histol. appliq. a la physiol. 12: 216, 1935. (21, 34, 39, 43, 46, 78).
97. *Loewenberg, B:.* „La lame spirale du limacon de l'oreille de l'homme". J. de l'anat. et de la physiol. 3: 605, 1870. (13, 33, 34, 35, 40, 41, 43, 125, 128).
98. *Loewenberg, B.:* „Anatomie et physiologie de l'oreille. Paris 1870. Pp. 48, p. 4. (13, 33, 34, 35, 40, 41, 43, 125, 128).
99. *Lorch, I. J.:* „Demonstration of Phosphatase in Decalcified Bone". Nature. 158: 269, 1946. (21, 23, 34, 38, 40, 77).
100. *Mc. Clung, C. E.:* „Handbook of Microscopical Technique". London 1939. Pp. 698, p. 259, 422. (34, 37, 38, 66, 84, 94, 117, 118).
101. *Mc. Namara, N. L., Murphy B. & W. A. Gore:* „Method of Simulteneous Fixation and Decalcification of Bone". J. Lab. & Clin. Med. 25: 874, 1049. (22, 33, 39, 42, 76, 77, 78).
102. *Mallory, F. B. & J. H. Wright:* „Pathological Technique". London 1918. Pp. 555, p. 49. (32, 33, 34, 38, 42, 43, 77, 84, 95, 117, 118).
103. *Manasse, P.:* „Handbuch der pathologischen Anatomie des menschlichen Ohres". Wiesbaden 1917. Pp. 307, p. 299. (33, 34, 35, 37, 39, 42, 43, 47, 77, 118, 133).
104. *Marchak, A.:* „P 32 Uptake by Nuclei". J. Gen. Phys. 25: 275, 1941. (77, 111).
105. *Meitzner, M.:* „Zur Kenntnis des häutigen Labyrinths...". Marburg 1908. Pp. 118, p. 36. Diss. (33).
106. *Morse, A.:* „Formic Acid-Sodium Citrate Decalcification...". J. Dent. Research. 24: 143, 1945. (22, 34, 39, 42, 45, 66, 76, 77, 93, 95, 118).
107. *Moseley, H. N.:* „On Methods for Preparing the Organ of Corti...". Quart. J. Micr. Sc. 12: 374, 1872. (13, 34, 40, 43, 46, 125, 129).

108. *Mott, F. W.:* „Discussion on the Biophysics and Biochemistry of the Neurone". Brit. med. J. 2: 780, 1912. (37).
109. *Murayama, A., T. Suzuki & M. Itoh:* „Vergleichende Betrachtungen über vier Arten von Entkalkungsflüssigkeiten". Tr. Soc. path. jap. 27: 99, 1937. (23, 26, 27, 30, 31, 42, 46, 70, 76, 84, 86, 87, 88, 91, 99, 100).
110. *Mygind, S. H. & Collaborators:* „Experimental-histological Studies on the Labyrinth". Acta oto-laryng. 33: 75, 1945. (33, 34, 35, 36, 39, 43, 49, 95, 118, 159).
111. *Mygind, S. H., H. C. Andersen & J. Arnvig:* „Experimental-Histological Studies on the Labyrinth". Acta oto-laryng. 33: 273, 1945. (61).
112. *Møbius, E.:* „Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie". Berlin 1912. Pp. 802, p. 1. (34, 36, 39, 42, 43, 47, 50, 67, 77, 95, 118, 125, 133, 137).
113. *Nuel:* „Beitrag zur Kenntnis der Säugethierschnecke". Arch. mikr. Anat. 8: 200, 1872. (34, 40, 129).
114. *Okkels, H.:* „Histofysiologiske studier over nyrefunktionen". Kbh. 1930. Pp. 192, p. 72. Disp. (23, 160).
115. *Partsch:* Verh. d. deutsch. Naturforsch. u. Aerzte. Wien 1894. (Cit. efter: Schaffer, J.: Versuche mit Entkalkungsflüssigkeiten". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 29: 308, 1902. (39).
116. *Pfleiderer:* „Ein Beitrag zur Pepsin- und Labwirkung". Arch. f. d. ges. Physiol. 64: 605, 1897. (19).
117. *Plum, C. M. & J. J. Pindborg:* „Quick Decalcification of Teeth". Acta odont. Scandinav. 7: 58, 1946. (23, 34, 38, 43, 66, 76, 118, 151).
118. *Podhradszky, L. v.:* „Ueber die Darstellung der Nervenelemente in aufgeklebten Schnitten". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 50: 285, 1933. (153).
119. *Politzer, A.:* „Zergliederung des menschlichen Gehörorgans". Stuttgart 1889. Pp. 245, p. 186. (14, 15, 33, 34, 40, 42, 77, 117, 125, 131).
120. *Pommer, G.:* „Zur Kenntnis der mikroskopischen Befunde der Knochenbildung und ihrer Untersuchungsmethoden". Ztschr. f. Anat. u. Entwickl. 75, 383, 1925. (39).
121. *Pritchard, U.:* „Methods of Preparing Cochlea for Microscopical Investigations". Quart. J. Micr. Sc. 12: 380, 1872. (13, 34, 39, 41, 43, 47, 77, 127, 129).
122. *Ranvier, L.:* „Technisches Lehrbuch der Histologie". Leipzig 1888. Heft 7: 907. (14, 34, 40, 43, 47, 125, 130).
123. *Reissner, E.:* „Zur Kenntnis der Schnecke in Gehörorgan der Säugethiere und des Menschen". Arch. f. mikr. Anat. p. 420, 1854. (13, 40, 41, 118, 126).
124. *Retzius, G.:* „Die Gestalt des membranösen Gehörorgans des Menschen". Biologische Untersuchungen. 2. Jahrgang, 1882. (47, 130, 134).
125. *Retzius, G.;* „Anatomische Untersuchungen". Stockholm 1872. Pp. 76, p. 15. (34, 129).
126. *Retzius, G.:* „Das Gehörorgan der Wirbelthiere". Stockholm 1881. Pp. 221, p. 1. (41, 125, 130).
127. *Richman, Gelfand & Hill:* „A Method of Decalcifying Bone for Histologic Section". Arch. Path. p. 92, 1947. (38, 66, 98).
128. *Ring, L. J.:* „Kemi". Kbh. 1940. Pp. 210, p. 65, 69, 86. (88).
129. *Romeis, B.:* „Handbuch der mikroskopischen Technik". München 1943. Pp. 956, p. 538. (20, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 42, 49, 77, 78, 84, 88, 118, 137, 138, 153).
130. *Rüdinger, A.:* „Atlas des menschlichen Gehörorganes". München 1875. (41).
131. *Saxen, A.:* „Zwei Silberimpregnationsmethoden zur Darstellung der neurofibrillären Strukturen...". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 54: 167, 1937. (41, 47, 137, 152, 153).
132. *Saxen, A.:* „Pathologische Anatomie der degenerativen Erkrankungen des Gehörorgans". Ergebn. d. allg. Path. u. path. Anat. 34: 1, 1939. (34, 40, 42, 43, 49, 77, 118, 133).
133. *Scarpa:* „Anatomische Untersuchungen des Gehörs und Geruchs". Nürnberg 1800. P. 76. (12, 40, 125).
134. *Schaffer, J.:* „Versuche mit Entkalkungsflüssigkeiten". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 29: 308, 1902. (18, 23, 27, 29, 31, 38, 41, 42, 69, 84, 85, 88, 92, 94, 117, 118, 119).
135. *Schaffer, J.:* „Entkalkung". In: Krause, R.: „Enzyklopädie der mikroskopischen Technik". Berlin 1926. P. 1149. (20).

136. *Schede, A.:* „Messung des Kalkgehaltes des Knochens". Verh. d. deutsch. ortopäd. Gesellsch. P. 100, 1928. (42, 67).
137. *Schiefferdecker:* „Ueber die Verwendung des Celloidins...". Arch. f. Anat. u. Physiol. I Abth. P. 199, 1882. (43, 131, 135).
138. *Schmorl, G.:* „Die pathologisch-histologischen Untersuchungs-methoden". Leipzig 1921. Pp. 459, p. 281. (26, 43).
139. *Schmorl, G.:* „Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden". Berlin 1934. Pp. 469, p. 41. (20, 26, 33, 38, 42, 43, 45, 67, 77, 78, 84, 88, 94, 117, 118, 137).
140. *Schmorl, G.:* „Darstellung feinerer Knochenstrukturen". Zentralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 10: 745. 1899. (17).
141. *Schmorl, G.:* „Untersuchungsmethoden". Leipzig 1909. Pp. 379, p. 34. (20).
142. *Schwartze, U.:* „Pathologische Anatomie des Ohres". Berlin 1878. Pp. 132, p. 116. (33, 41, 130).
143. *Shambough, G. E.:* „Cytology of the Internal Ear". In: Cowdry, E. V.: „Special Cytology". New York 1932. P. 1335. (33, 49, 125).
144. *Shelling, D. H. & M. B. Halpherson:* „A Rapid Method for Decalcification". Arch. Path. 5: 835, 1928. (21, 39, 41, 45).
145. *Shimodaira, G.:* „Beiträge zur experimentellen Untersuchung über den Einfluss der Bakterientoxinen auf das Gehörorgan...". Mitt. ü. allg. Path. u. path. Anat. 1: 421, 1919. (36).
146. *Solovtzoff, N.:* „Zur Anatomie des Cortischen Organes...". Monatschr. f. Ohrenh. 59: 557, 1925. (33, 36, 41, 43, 135).
147. *Strelzoff:* „Ueber die Histiogenese der Knochen". Untersuch. path. Inst., Zürich. Heft 1: 5, 1873. (13, 14, 18, 33, 37, 46).
148. *Van der Stricht:* „Sur la structure du tissu osseux". Arch. de biol. 9: 29, 1889. (15, 43, 46, 77).
149. *Stricker;* „Handbuch der Lehre von Geweben". Leipzig 1871. Pp. 1248, p. 1. (12, 34, 37, 43).
150. *Støhr, P.:* „Lehrbuch der Histologie". Jena 1905. Pp. 515, p. 293. (20, 37).
151. *Støhr, P.:* „Lehrbuch der Histologie". Jena 1915. Pp. 515, p. 20. (20, 32, 34, 37 38, 42, 43, 66, 77, 118).
152. *Szymonowizc, L.:* „Lehrbuch der Histologie". Würzburg 1901. Pp. 455, p. 388. (18, 38, 42, 77, 78, 117).
153. *Takezawa:* „Experimentelle Untersuchungen über die professionelle Schwerhörigkeit". Mitt. a. d. med. Akad. zu Kioto. 12: 923, 1934. (34, 36, 41, 47, 49, 133).
154. *Tanaka, F.:* „Ueber de postmortalen Veränderungen der Hörnervenfasern". Internat. Zentralbl. f. Ohrenh. 10: 443, 1912. (137).
155. *Thoma, R.:* „Eine Entkalkungsmethode". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 8: 191, 1891. (38, 45, 93, 118).
156. *Thoma, R.:* „Ein Apparat zum raschen Fixieren und Erharten...". Ztschr. f. wissensch. Mikr. 14: 333, 1897. (35).
157. *Voltolini:* „Ueber die bisher verkannte Gestalt des häutigen Labyrinths...". Arch. f. path. Anat. u. Physiol. 28: 227, 1863. (41).
158. *Vraa-Jensen, G. & A. Juul:* „On the Effect of Ascaridole on the Inner Ear". Acta pharm. 3: 51, 1947. (33, 34, 35, 36, 39, 42, 43, 47, 48, 49, 95, 101, 118, 152).
159. *Vraa-Jensen, G.:* „The Motor Nucleus of the Facialis Nerve". Kbh. 1942. P. 157, p. 25. Disp. (153).
160. *Wada, T.:* „Anatomical and Physiological Studies on the Growth of the Inner Ear of the Albino Rat". Am. Anat. Mem. 10: 5, 1923. (34, 36, 39, 43, 47, 49).
161. *Wagoner, G.:* „The Technique of Preparing and Staining Large Bone Sections...". J. Bone & Joint Surg. 13: 325, 1931. (22, 33, 38, 45, 46, 77, 95, 118).
162. *Waldeyer, W.:* „Untersuchungsmethoden". In: Stricker: „Handbuch der Lehre von den Geweben". Leipzig 1871. P. 961. (15, 34, 41, 43, 129).
163. *Weidenreich, F.:* „Knochenstudien". Ztschr. f. Anat. u. Entwicklungsgesch. 69: 392, 1923. (34, 38, 43, 118).

164. *Weil, A.:* „A Rapid Method for Staining Myeline Sheaths". Arch. Neurol & Psychiatr. 20: 392, 1928. (152).
165. *Werner, C. F.:* „Die experimentelle Histopathologie des Innenohres...". Ztschr. f. Hals-Nasen-Ohrenh. 36: 332, 1934. (33, 44).
166. *Werner, C. F.:* „Das Labyrinth". Leipzig 1940. Pp. 400, p. 66. (33, 34, 35, 36, 39, 41, 42, 43, 44, 49, 50, 62, 78, 93, 95, 118, 123, 125, 134, 136).
167. *Westin, G.:* „Ueber Zahnveränderungen in Fällen von Skorbut bei Homo...". Bd. I, Stockholm 1913, P. 117. (39, 43, 44, 45, 46, 117, 118, 151).
168. *White, C. P.:* „A New Method of Decalcification". J. Path. & Bact. 26: 715, 1923. (21, 39, 40, 45).
169. *Williams, A.:* „The Preparation of Combined Hard and Soft Tissues...". Dental Cosmos. 69: 715, 1927. (32, 33, 34, 35, 36, 38, 42, 43, 46, 66, 76, 94, 117, 118).
170. *Wilson, G. H.:* „Rapid Decalcification with Nitric Acid". J. Path. & Bact. 34: 531, 1934. (21, 30, 34, 38, 41, 42, 43, 45, 46, 66, 78, 117, 118).
171. *Wittmaack, K.:* „Ueber Markscheidendarstellung und den Nachweis von Markhüllen der Ganglienzellen im Akustikus". Arch. f. Ohrenh. 61: 18, 1904. (47, 125, 132, 153).
172. *Wittmaack, K.:* „Zur histopathologischen Untersuchung des Gehörorganes...". Ztschr. f. Ohrenh. 51: 148, 1906. (34, 36, 39, 41, 43, 49, 95, 118, 132).
173. *Yoshii, U.:* „Experimentelle Untersuchungen über die Schädigungen des Gehörorgans durch Schalleinwirkung". Ztschr. f. Ohrenh. 58: 201, 1909. (34, 35, 43, 47, 49, 50, 51, 118, 133).
174. *Zachariades:* „Sensibilite du tendon aux acides". Compt. Rend. Soc. de Biol. Paris. 52: 251, 1900. (19, 85).
175. *Zagelmeier, J.:* „Ueber die Anlage des Extremitätenskelettes...". Erlangen 1891. Pp. 32, p. 17. Inaug.-dissert. (16, 34, 38, 46).
176. *Ziegler, P.:* „Ein Beitrag zur Technik der histologischen Untersuchung des Knochens". Festschr. f. Carl v. Kupffer. Jena 1899, p. 49. (17, 26, 27, 29, 33, 34, 35, 38, 45, 46, 78, 84, 93, 99, 100, 117).
177. *Kristensen, H. K.:* „Recherches sur l'oreille interne de cobayes exposes aux bruits d'ateliers de tissage". Acta oto-laryng. XXXV: 220, 1947. (49).

Tidsskriftforkortelserne er i overensstemmelse med Quarterly Cumulative Index Medicus.

AALBORG STIFTSBOGTRYKKERI